

No. de páginas: 83

Lugar de realización: Sistemas Biológicos

Prácticas realizadas en: Servicio social bibliográfico

Proyecto genérico: Evaluación de productos relacionados con la salud

Contiene:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Fotografías | <input type="checkbox"/> Ilustraciones |
| <input type="checkbox"/> Gráficas | <input type="checkbox"/> Mapas |
| <input checked="" type="checkbox"/> Tablas | <input checked="" type="checkbox"/> Diagramas |
| <input type="checkbox"/> Trípticos | |

Vo.Bo. Asesor:  _____

Fecha liberación texto completo: 20210903

NOTA: La versión digital de este reporte, solo podrá ser consultada en cualquier Unidad académica de la Universidad, incluyendo a Rectoría General



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Técnicas y herramientas moleculares empleadas para la obtención de material genético

Torres Rosales, Francisco Javier

2162033296

Asesores

Interno: Esquivel Campos, Ana Laura

19 de Septiembre de 2021

Sistemas Biológicos
Química Farmacéutica Biológica

Técnicas y herramientas moleculares empleadas para la obtención de material genético

Torres Rosales, Francisco Javier 2162033296

Interno: Esquivel Campos, Ana Laura

19 de Septiembre de 2021

83

Sistemas Biológicos

Servicio social bibliográfico

Evaluación de productos relacionados con la salud

X
X

20210903

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

Datos del Alumno

Nombre :	
Matrícula :	Licenciatura :
Domicilio :	
Teléfono :	Celular :
Correo Electrónico :	CURP :

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto :							
Lugar donde se realizó el Servicio Social :							
Dependencia :							
Entidad Federativa :							
Municipio :				Localidad :			
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: _____ Tipo: _____

Orientación: _____

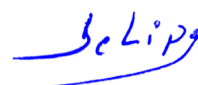
FIRMAS


Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico



Alumno
Nombre, firma

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico



Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

México, CDMX a 20 de septiembre del 2021

Dr. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
JEFE DEL DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS
PRESENTE

Por medio de la presente me permito comunicar a usted que el alumno **Francisco Javier Torres Rosales**, matrícula **2162033296** concluyó el proyecto de servicio social: **“Técnicas y herramientas moleculares empleadas para la obtención de material genético”**, que se realizó en el Laboratorio de biología experimental (en línea) ubicado en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. **Del 01 de marzo 2021 al 03 de septiembre 2021** bajo mi asesoría, cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

Dra. Ana Laura Esquivel Campos
No. 33148

**Universidad Autónoma Metropolitana
CBS
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica**



**“Técnicas y herramientas moleculares empleadas para la
obtención de material genético”**

**Alumno: Francisco Javier Torres Rosales
Matrícula: 2162033296**

**Asesora: Dra. Ana Laura Esquivel Campos
No. Eco. 33148**

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Ana Laura Esquivel Campos', is located to the right of the text identifying the advisor.

Fecha de inicio: 01 de marzo de 2021.

Fecha de término: 03 septiembre de 2021

SEPTIEMBRE 2021

Índice

Introducción a las técnicas moleculares	3
Técnicas y herramientas moleculares de obtención de material genético	3
Tipos y características de los métodos de obtención del material genético	3
Etapas del proceso de extracción.....	5
Convencional.....	7
Separación de proteínas y lípidos.....	7
Precipitación del material genético.....	7
Comercial.....	8
Unión del ácido nucleico a la matriz inorgánica y lavado con protocolos comerciales.....	8
Recuperación del ácido nucleico de la matriz.....	8
Desarrollo de técnicas.....	9
Consideraciones.....	9
Muestra	9
Materiales y Bioseguridad	11
Calidad de material genético	12
Métodos de extracción ADN.....	12
Métodos para extracción de células eucariotas.....	13
Aislamiento de ADN para aspirado de sangre total y médula ósea.....	13
Aislamiento de ADN para líquido amniótico, tejido fresco / congelado y células bucales	17
Procedimiento de aislamiento de ADN para la saliva	28
Aislamiento de ADN a partir de tejidos FFPE (tejido embebido en parafina).....	31
Aislamiento de ADN mediante perlas magnéticas a partir de tejidos, células cultivadas, sangre periférica y saliva.....	35
Métodos para extracción de células vegetales.....	38
Protocolo CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) a partir de tejido vegetal.....	38
Métodos para extracción de células procariontes.....	42
Extracción de ADN en bacterias.....	42
Extracción alcalina en procariontes.....	45
Métodos de extracción especiales.....	48
Extracción con solución TRI-REAGENT para tejido animal, vegetal, bacterias, virus, células cultivadas y sangre.	48
+ Extracción de ADN para muestras forenses por Chelex.....	50

Métodos de extracción de ARN.....	53
Extracción de ARN mediante el protocolo de reactivo TRIzol para aspirado de sangre total y médula ósea.....	54
Extracción de ARN para sangre total, aspirado de médula ósea, tejido fresco / congelado y tejido FFPE (tejido embebido en parafina).....	58
Aislamiento de ácido nucleico para FFPE (tejido embebido en parafina).....	63
Análisis de contraste.....	67
Discusión.....	68
Conclusión.....	73
Referencias	73
Resumen.....	76

- **Introducción a las técnicas moleculares**

La biología molecular tiene como objetivo el estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular. Pretendiendo explicar los fenómenos de la vida a partir de sus propiedades macromoleculares, como principales objetos de estudio son los ácidos nucleicos. Para permitir su estudio, nace la necesidad de crear técnicas moleculares que detectan y cuantifican secuencias genéticas específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) (*Peña Castro, Gregorio Ramírez, Barrera Figueroa, 2013*). Estas técnicas moleculares tienen como finalidad analizar y manipular los ácidos nucleicos, permitiendo detectar e identificar tanto microorganismos, como enfermedades genéticas y creación de productos genéticamente mejorados. Existe un aumento progresivo de técnicas moleculares en el área de cáncer y enfermedades genéticas, convirtiendo el diagnóstico molecular en una de las áreas en crecimiento, revolucionando las estrategias para el tratamiento de diversas patologías y condiciones de salud. Por consiguiente, se elaboran herramientas para la obtención de material genético con diferentes procesos químicos y físicos (*Mellado, 2020*).

- **Técnicas y herramientas moleculares para la obtención de material genético**

La extracción del material genético es el paso más crucial en todo el proceso relacionado con la biología molecular. Se suelen utilizar kits comercializados que incluyen el protocolo específico para la extracción. Los métodos de extracción se caracterizan por la lisis de la célula, la inactivación de las enzimas nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos de los demás restos celulares. Pueden ser de diferentes tipos: rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica), por tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles) o por digestión enzimática (proteínasa K) (*Mellado, 2020*).

La obtención de material genético se puede realizar de diferentes tipos de muestra, como sangre, tejido o mucosa, por ende, las herramientas moleculares de extracción van a depender del tipo y composición de la muestra, igualmente, se toma en cuenta cuál es el analito de interés para extraer (ADN o ARN), con el fin de ser utilizada en otra técnica molecular.

- **Tipos y características de los métodos de obtención del material genético**

La extracción de ácido nucleico es uno de los pasos más fundamentales en biología molecular, y se utiliza de forma rutinaria en muchas áreas de las ciencias biológicas y médicas, ya que este procedimiento marca un punto de partida en cualquier kit de diagnóstico molecular. Este procedimiento crucial se conoce desde hace más de un siglo y se ha desarrollado sustancialmente en las últimas décadas.

La extracción es el método por el cual se obtiene el ADN o ARN a partir de material biológico, utilizando técnicas físicas y químicas. Para obtener el material genético hay diferentes procesos que se pueden basar en diferentes fenómenos como químicos y físicos, ejemplos de estos son; la precipitación, ultrafiltración, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad. El uso del tipo de proceso u otro dependerá de la muestra ocupar, la cantidad de ésta, el tipo de ácido nucleico y la técnica posterior con la que se va a trabajar (Alejos, 2010). A continuación, se van a explicar los principales fundamentos de los procesos que se ocupan en la obtención de ácidos nucleicos (Mellado, 2020):

a) Extracción/precipitación: tiene lugar un primer paso en el que se extraen contaminantes como fenol y cloroformo de la muestra de ácidos nucleicos extraídos, y un segundo paso en el que se precipitan los ácidos nucleicos con isopropanol o etanol. Es un método laborioso y que utiliza productos tóxicos. El fenol y el cloroformo actúan como inhibidores de la reacción de la PCR, por lo que si se utiliza este método es necesario eliminar restos de estos productos para que la posterior reacción de PCR sea correcta.

b) Ultrafiltración: se utiliza una membrana que actúa de filtro sobre la que se coloca la muestra de ácidos nucleicos extraídos y se somete a centrifugación. De esta forma, los ácidos nucleicos libres de sustancias contaminantes quedan retenidos en la membrana y posteriormente se recuperan añadiendo agua o un tampón específico.

c) Ultracentrifugación: por diferencia de densidad se separan las partículas, las más densas sedimentan y las menos densas flotan. Para favorecer este proceso se lleva a cabo la centrifugación.

d) Cromatografía: se utiliza una matriz con poros hidrofílicos que dejará pasar las moléculas más pequeñas. Las moléculas grandes quedarán eluidas en el volumen vacío por orden decreciente.

e) Electroforesis: se basa en la separación de los ácidos nucleicos mediante gel de poliacrilamida. Las moléculas más pequeñas se moverán a mayor velocidad y las más grandes más despacio. Cuando las moléculas de ADN son muy grandes, se usan geles de agarosa. En función del tamaño de las moléculas, se pueden usar diferentes concentraciones de agarosa o poliacrilamida en el gel.

Todos los protocolos de obtención de material genético se basan en los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción. Los grupos fosfato tienen una fuerte tendencia a repelerse, debido a su carga negativa, lo que permite disolver a los ácidos nucleicos en soluciones acuosas y formar una capa hidratante alrededor de la molécula. Aunque los ARN poseen uracilo mientras que los ADN presentan timina, los

ácidos nucleicos exhiben propiedades bioquímicas básicas similares, pero pueden tener estructuras tridimensionales bastante distintas (genómico, plásmido, ARNt, ARNm, ARNr, etc.). Sin embargo, a pesar de las diferencias estructurales, los métodos más utilizados descritos en el presente texto se pueden aplicar al ADN en sus múltiples formatos organizativos (cromosómico, plásmido, etc.), así como al ARN y sus formatos (ARNm, ARNr, ARNt, miARN, etc.) con modificaciones menores (*Falcon, 2007*).

Los métodos usuales utilizan solventes orgánicos para separar a las proteínas de los ácidos nucleicos y, una vez suspendido en la fase acuosa, aislarlo por precipitación con etanol. Estos métodos requieren preparar soluciones y la extracción puede tomar desde unas horas hasta varios días por los numerosos pasos que deben realizarse. Por ende, existen en el mercado combos o kits de extracción que utilizan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente capaces de retener varios microgramos de ácidos nucleicos y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores, es decir, mayor sensibilidad al extraer y eficiencia del método obteniendo la misma o mejor calidad de ácidos nucleicos que un método convencional (*Alejos, 2010*).

- **Etapas del proceso de extracción**

La selección del método de extracción dependerá del organismo bajo estudio, el tejido disponible y su estado de conservación, la técnica que se aplicará posteriormente, así como la infraestructura de los laboratorios, los recursos económicos y tiempo para obtener resultados. Al momento de realizar el método de extracción, el tipo de muestra va influir la eficiencia del protocolo que se ocupe para extraer el material genético en cuestión de la cantidad de este y composición química de la muestra que pueda interferir en la extracción. Por eso los primeros protocolos se rigen en cinco etapas: Homogeneización de la muestra, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución de la muestra. Las dos primeras etapas, homogeneización y lisis, son el mismo fundamento o propósito tanto la técnica convencional y la comercial. Por otro lado, las últimas etapas del método convencional difieren del método comercial, porque en el comercial no hay separación de proteínas y lípidos, lo contrario, hay una unión en una matriz inorgánica posteriormente una recuperación del material genético de esa matriz (*Alejos, 2010*).

- Homogeneización de la muestra

La homogeneización tanto mecánica o química tiene como objetivo en romper las uniones entre las células para facilitar la interacción con las soluciones de lisis que ayudan a liberar el material genético. A continuación, se va a describir la homogeneización mecánica y química.

La homogeneización mecánica consiste en utilizar nitrógeno líquido, se procede en macerar la muestra con nitrógeno líquido, en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo muy fino. El nitrógeno líquido, congela de inmediato la muestra y evita que se formen cristales en el interior de la célula que rompen la estructura celular e inicie el proceso de degradación. Este procedimiento, se puede utilizar en tejido fresco o congelado (semillas, plántulas, tejidos fibrosos o viscosos y hongos). (Alejos, 2010.) Igualmente se ocupa pistilos u homogeneizadores, los pistilos disgregan la muestra mediante fricción con la pared del tubo que contiene la muestra, adicionalmente se puede utilizar algún material abrasivo como vidrio pulverizado o resinas. El proceso se realiza manualmente, con pistilos plásticos o con ayuda de dispositivos electrónicos, conocidos como homogeneizadores (Alejos, 2010.).

Es recomendable adicionar un poco del buffer de lisis antes de iniciar, estas soluciones desnaturalizan a las proteínas y mantienen estables a los ácidos nucleicos. Cuando se utilizan dispositivos es necesario colocar el tubo sobre una cama de hielo, lo cual evita que los ácidos nucleicos se fragmenten por el calor que genera la fricción. El uso de pistilos u homogeneizadores se recomienda en general para muestras pequeñas y tejidos blandos. No es recomendable utilizar este método con tejidos congelados, porque las células del interior del tejido se descongelan antes de entrar en contacto con la solución de lisis y el ADN se fragmenta por acción de las nucleasas. En este caso se recomienda que el tejido se disgregue en presencia de nitrógeno líquido.

En la homogeneización mediante agentes químicos, la muestra se mantiene en solución a altas temperaturas en presencia de detergentes, proteasas y agentes caotrópicos que rompen las uniones entre las células o que incluso pueden perforar la membrana celular. La disgregación química es recomendable para bacterias, muestras pequeñas de tejidos frescos o sangre. En tejidos fibrosos es recomendable cortar en fragmentos pequeños para favorecer su disgregación.

Alternativamente se pueden utilizar los buffers comerciales como RNALater® ICE (Ambion®). La muestra se sumerge en el reactivo y se mantiene a -20°C toda la noche, posteriormente se puede descongelar la muestra y macerar sin requerir nitrógeno líquido. (Falcon, 2007)

A considerar, al iniciar la homogeneización es necesario contar con información sobre la cantidad apropiada de tejido que debe utilizarse pues una disgregación rápida y completa es esencial para asegurar la obtención del material genético y evitar su degradación. Si se excede la cantidad recomendada se puede sobresaturar el sistema, con lo que se afecta el rendimiento y aumentan las impurezas del extracto, de manera que es aconsejable realizar

experimentos preliminares con distintas cantidades de material inicial para determinar cuál es la cantidad apropiada, en particular en los sistemas de extracción tradicionales. Por ejemplo, en el caso de tejido vegetal, el material liofilizado contiene mayor cantidad de células, por lo que se recomienda utilizar solo el 50% de peso fresco. Si el tejido contiene una alta cantidad de polisacáridos o polifenoles, se inicia con el 25% del peso. Sin embargo, si la especie tiene un genoma pequeño es posible incrementar la cantidad hasta un 50%. En el caso de tejido animal, aunque el peso o la cantidad inicial sea la misma el rendimiento puede variar significativamente entre tejidos (*Falcon, 2007*).

- Lisis celular

Durante el proceso de lisis las interacciones entre las moléculas que conforman la pared, la membrana celular y nuclear se modifican o destruyen permitiendo que los ácidos nucleicos se liberen. Se utilizan soluciones básicas, detergentes o agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan a los ácidos nucleicos. Muchas soluciones de lisis contienen también EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg^{2+} e impide el funcionamiento de las nucleasas. Los componentes celulares no solubles como el material fibroso y proteínas que permanecen en solución se separan de los ácidos nucleicos por centrifugación (*Orfao & Morente, 2011*).

Tanto la homogeneización como la lisis celular son similares en los protocolos tradicionales y comerciales. Las particularidades del resto de las etapas se explican, a continuación, independientemente para cada uno de los protocolos.

- Separación de proteínas y lípidos con protocolos convencionales

En esta etapa se separa los ácidos nucleicos de las proteínas y lípidos se realiza mediante solventes orgánicos y ciclos de centrifugación. Se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos. La fase acuosa y la orgánica se separan por centrifugación lo que permite aislar al ácido nucleico de interés. Los solventes que se usan frecuentemente son el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico (*Alejos, 2010*).

- Precipitación del analito genético

Después de que son eliminados los lípidos y las proteínas, se recupera el analito genético. Para ello, se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio que se unen a los grupos fosfato, esta mezcla reduce las fuerzas repulsivas entre las cadenas y permite que el analito se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble. Un paso de centrifugación permite que el analito permanezca en el fondo del tubo mientras que el etanol es desechado. Los restos de etanol se eliminan con un lavado con etanol al 70% y el remanente se elimina por evaporación. Redisolución del ácido nucleico Una vez que se ha eliminado el etanol, el paso siguiente es hidratar

el ácido nucleico para mantenerlo en solución. En el caso de emplear agua, el pH debe ser de 7 para permitir la redisolución completa del ácido nucleico y evitar una hidrólisis ácida.

Cuando se utiliza una solución amortiguadora, es preferible utilizar una solución de Tris-HCl a 10mM y EDTA a 0.1M a un pH de 8.0 para almacenar el material. Cuando se está disolviendo el ácido nucleico es importante evitar el pipeteo y la agitación agresiva pues se pueden fragmentar moléculas de alto peso molecular (*Alejos, 2010*).

- Unión del ácido nucleico a la matriz inorgánica y lavado con protocolos comerciales

En el caso del kit con membrana de sílice, en algunos casos a la mezcla de lisis se le añade la solución de unión que tiene un pH específico. Antes de pasar la solución de lisis a través de la columna, se adiciona etanol a la solución, eliminando la capa hidratante del ácido nucleico y exponiendo sus grupos fosfato, facilitando con ello la adsorción de la molécula a la membrana cargada positivamente. Los lípidos y proteínas no son afines a la membrana y se eliminan con ayuda de la solución de lavado y un ciclo de centrifugación, mientras que el material genético permanece unido a la matriz (*Falcon, 2007*).

El kit con perlas magnéticas además de utilizar soluciones a pH específicos, utiliza un imán o magneto que atrae a las perlas para separarlas de las soluciones en las que se encuentran suspendidas. En este caso, se añade a la solución de lisis una solución amortiguadora a pH ácido que permite cargar positivamente a las perlas, favoreciendo la unión del ácido nucleico. Las proteínas y lípidos tienen baja afinidad por las perlas y son eliminados con soluciones de lavado a pH fisiológico. Las perlas son retenidas en la pared del microtubo con el magneto, mientras que la solución con los contaminantes se elimina por pipeteo (*Orfao & Morente, 2011*).

- Recuperación del ácido nucleico de la matriz

En los kits es necesario liberar al ácido nucleico de la matriz, La membrana y el ácido nucleico se deshidratan con soluciones de lavado y ciclos de centrifugación, después se recomienda centrifugar nuevamente la columna para evaporar el etanol y eliminar el exceso de las soluciones. Posteriormente, se adiciona agua o solución amortiguadora al centro de la membrana, se espera a que el ácido nucleico se hidrate, se centrifuga para recuperarlo de la matriz y suspenderlo

Es necesario saber que la mayoría de los kits tienden a ser generales a la hora de su aplicación, pero se diseñan con un propósito específico. Por ejemplo, un kit para extraer el material genético de sangre total, considera la presencia de hemoglobina y eritrocitos durante el proceso. Este método será más agresivo en comparación con un kit diseñado para extraer ácido nucleico de células o tejidos animales. En los manuales proporcionados por el fabricante se detallan, además de los pasos a seguir en cada caso, la cantidad de muestra recomendada y el rendimiento esperado de acuerdo al tipo de tejido. Esta información debe tomarse en cuenta al momento de elegir un kit (*Alejos, 2010*).

DESARROLLO DE TÉCNICAS

La extracción exitosa de ADN o ARN de alta calidad de tejido o células requiere cuatro pasos esenciales: interrupción suficiente del tejido y las estructuras celulares para crear un lisado, desnaturalización de complejos de nucleoproteínas, inactivación de nucleasas, por ejemplo, ARNasa para extracción de ARN y ADNasa para extracción de ADN y purificación del ácido nucleico (Alejos, 2010.).

- Consideraciones

+ Muestra

La muestra es fundamental que cumpla con características, transporte y almacenamiento adecuado para realizar estas técnicas para obtener resultados óptimos y confiables.

En la siguiente tabla se en lista las muestras que se hablan en este escrito, igualmente, consideraciones que se deben tomar para estas muestras.

Tabla 1. Tipos de muestras para la extracción de ácidos nucleicos y consideraciones.

(Mullegama et al., 2018; QIAGEN, 2010-2018)

TIPO DE MUESTRA	PROCESO DE RECOLECCIÓN	Almacenamiento	Notas
Sangre	Se recolecta en tubos con anticoagulantes (EDTA, citrato de sodio o heparina de sodio) de sangre periférica.	15-25 ° C Se extrae el material genético 24 h- 96 h posteriores a la recolección.	se comienza con <3 ml de sangre total o aspirado de médula ósea, se debe agregar un volumen de sangre o aspirado de médula ósea a tres volúmenes de tampón de lisis de glóbulos rojos.
Aspirado de medula ósea	Consiste en la introducción de una aguja a través del hueso hacia el interior de la médula ósea y la subsiguiente aspiración del tejido de su interior con una jeringuilla. En general se realiza en el esternón o en la pelvis.	en tubos con anticoagulantes a temperaturas de 15-25 ° C Se extrae el material genético 24 h- 96 h posteriores a la recolección.	se comienza con <3 ml de sangre total o aspirado de médula ósea, se debe agregar un volumen de sangre o aspirado de médula ósea a tres volúmenes de tampón de lisis de glóbulos rojos.
Células cultivadas	Para el aislamiento de ADN, se necesitará un tubo de centrifuga cónico de 15 ml estéril o dos matraces T-25 de células cultivadas, lo que producirá un volumen de 10-15 ml (óptimamente 2×10^6 células).		Las muestras pequeñas deben ajustarse a 200 μ l con PBS antes de cargarlas. Para muestras más grandes de 200 μ l, la cantidad de tampón de lisis y otros reactivos añadidos a la muestra antes la

			carga debe aumentarse proporcionalmente.
Tejido fresco/congelado Planta / Animal	Asegurar de que el tejido se corte en los pedazos más pequeños posibles con un bisturí limpio. Se puede aplicar una presión suave con el bisturí para disgregar aún más pequeños trozos de tejido. El tejido fresco debe congelarse, en RPMI 1640 o en hielo. Se requiere un mínimo de 5 mg de tejido.	congelar tejido para un almacenamiento a largo plazo, congele en nitrógeno líquido y transfíralo inmediatamente a -70 ° C. El tejido se puede almacenar durante varios meses a -70 ° C. Para procesar, no permita que el tejido se descongele durante el pesaje o la manipulación antes de la interrupción en Buffer RLT. Si el tejido no se está aislando de inmediato (lo que se recomienda), el tejido congelado se puede almacenar entre -60 ° C y -80 ° C, y el tejido fresco se puede almacenar en RPMI 1640 a 2-8 ° C.	Las muestras pequeñas deben ajustarse a 200 µl con PBS antes de cargarlas. Para muestras más grandes de 200 µl, la cantidad de tampón de lisis y otros reactivos añadidos a la muestra antes la carga debe aumentarse proporcionalmente.
Hisopo bucal	Para obtener células bucales, raspe el hisopo firmemente contra el interior de cada mejilla seis veces. Deje secar al aire el hisopo durante al menos 2 h después de la recolección. Coloque el hisopo en una funda protectora estéril proporcionado para el transporte.	la muestra puede almacenarse a temperatura ambiente (15–25 ° C) o congelarse (-15 ° C a -20 ° C) hasta por 1 año.	Se recomienda obtener células bucales de los siguientes tipos de hisopos: CEP (Omni Swabs de Whatman, parte de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), algodón y DACRON (Daigger Scientific, Vernon Hills, IL, Hardwood Products Company, Guilford, ME o Hain Diagnostika).
Tejido FFPE (tejido embebido en parafina)	tejido FFPE en forma de cuatro a diez portaobjetos sin teñir del bloque de parafina cortados en secciones de 5 µm acompañados de un portaobjetos de referencia H&E. Para la extracción de ARN, se requieren al menos 16 portaobjetos sin teñir del bloque	Utilizar un tiempo de fijación de 14–24 horas. Limitar los tiempos de fijación, ya que una fijación prolongada (por ejemplo, >24 horas) podría	Deberán emplearse procedimientos estándar de fijación en formalina e incorporación en formalina para limitar la

	de parafina cortados en secciones de 5 µm.	provocar una mayor fragmentación del ADN, con lo que se conseguiría un peor rendimiento en los ensayos posteriores).	fragmentación de ADN Fijar las muestras de tejidos en formalina según el protocolo del laboratorio (generalmente se acepta formalina neutra tamponada al 10 %) lo antes posible tras la escisión quirúrgica
Saliva	Las muestras de saliva pueden exponerse a temperaturas que oscilan entre -20 ° C y 50 ° C durante la recolección y el transporte	Las muestras se pueden almacenar a temperatura ambiente (15-25 ° C) hasta por 1 año.	
Medios de cultivos (bacteria)	Cultivarse conforme la cepa y el medio de cultivo determinado por la técnica	Conforme el crecimiento de la cepa y características de esta	

+ Materiales y bioseguridad

La bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio son esenciales para estos métodos porque son métodos muy sensibles, por ende, necesitan condiciones controladas y materiales limpios y sanitizados para evitar cualquier interferencia durante la obtención del material genético.

A continuación, se presenta una tabla donde se enlista los equipos y materiales que probablemente se usan en cualquier método de extracción descrito en este documento.

Estas técnicas trabajar en lugares libres de flujo y acceso controlado

Tabla 2. Materiales y equipos esenciales en los métodos de extracción de ácidos nucleicos.

Materiales y Equipos	
Tubos centrifugas cónicos 15ml, 1.5ml, 2ml	Bloque calefactor o baño de agua (58°C-70°C o 90°C)
Pipetas serológicas	Hielo
Micropipetas (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Equipo de protección:
Puntas para micropipetas	Careta y lentes de seguridad
Cabina de bioseguridad	Guantes y cubrebocas
Centrifuga	Traje de bioseguridad (si es necesario)
Microcentrífuga	Cloro, Etanol, Agua, DNasa, RNasa.

La absorbancia máxima de las soluciones de ADN y ARN se encuentra en una longitud de onda de 260 nm. Por lo tanto, la concentración se determina midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm frente a un blanco.

Las proteínas, como los ácidos nucleicos, absorben la luz en el rango ultravioleta con una absorbancia máxima a 280 nm. Dado que, las soluciones de ácido nucleico absorben parcialmente la luz a 280 nm y las soluciones de proteínas absorben parcialmente la luz a 260 nm, la relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm (A_{260} / A_{280}) se puede utilizar para proporcionar una estimación de la pureza de la solución de ácido nucleico. Las soluciones de ADN y ARN bien purificadas tienen valores A_{260} / A_{280} de 1,8 y 2,0 respectivamente. Si hay contaminación de proteínas, la relación A_{260} / A_{280} será significativamente menor.

De manera similar, la absorción a 230 nm indica la presencia de contaminantes como carbohidratos, péptidos, fenoles o compuestos aromáticos. Las muestras bien purificadas deben tener un A_{260} / A_{230} relación de aproximadamente 2,2.

Se puede utilizar una absorbancia a 325 nm para indicar la presencia de residuos en la solución o que la cubeta en sí está sucia

Tabla 4. especificación de rangos que debe tener un ácido nucleico de pureza. (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020)

Rangos de luz ultravioleta	Parámetros
A_{260} / A_{280} proteínas/ácidos nucleicos	1.8 y 2 si es menor existe contaminación
A_{260} / A_{230} proteínas/contaminantes	2.2 si es menor existe contaminación

- Extracción de ADN

La extracción de ADN se puede dividir en métodos basados en solución o en columna. Muchas de estas técnicas se han industrializado en kits disponibles comercialmente que aceleran el proceso de extracción y presentan menos riesgos para la salud. Los pasos básicos del aislamiento del ADN implican la alteración de la estructura celular para crear un lisado, la separación del ADN soluble de los restos celulares y otro material insoluble, y la purificación del ADN de interés a partir de proteínas solubles y otros ácidos nucleicos. Aquí describimos el aislamiento de ADN de sangre total, aspirado de médula ósea, líquido amniótico, células bucales, tejido fresco y FFPE, saliva, en otro tipo de muestra. (Mullegama et al., 2018)

- Métodos para extracción de células eucariotas

+ Aislamiento de ADN mediante para aspirado de sangre total y médula ósea

Introducción y Fundamentó

Este Kit está diseñado para la purificación de ADN genómico, mitocondrial o viral de alto peso molecular a partir de una variedad de fuentes de muestras.

El ADN de alta calidad se puede purificar a partir de tipos de muestras que incluyen sangre completa, capa leucocitaria, médula ósea y fluidos corporales

El procedimiento de purificación elimina contaminantes e inhibidores de enzimas, como proteínas y cationes divalentes, y el ADN purificado está listo para su uso inmediato en aplicaciones sensibles posteriores o para su archivo. (Ali et al., 2017)

Esta técnica se basa en que las células se lisan con un detergente aniónico en presencia de un estabilizador de ADN. El estabilizador de ADN limita la actividad de las ADNasas intracelulares y también las ADNasas que se encuentran en otras partes del medio ambiente. Luego, el ARN se elimina mediante tratamiento con una enzima digestiva de ARN. Otros contaminantes, como las proteínas, se eliminan mediante precipitación de sal. Finalmente, el ADN genómico se recupera por precipitación con alcohol y se disuelve en solución de hidratación (EDTA 1 mM, Tris · Cl 10 mM pH 7,5). (QIAGEN,2014).

Tiempo del proceso: 25 minutos aproximadamente y 12 hrs. de incubación

Material

1. Aspirado de sangre total o de médula ósea.
2. Kit de sangre Gentra Puregene
(A) Solución de lisis de glóbulos rojos.
(B) Solución de lisis celular.
(C) Solución de precipitación de proteínas.
(D) Solución de hidratación de ADN.
3. Isopropanol al 100% (2-propanol).
4. Etanol al 70%

Método

1. Agregar 9 ml de solución de lisis de glóbulos rojos a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml.
2. Añadir 3 ml de sangre entera bien mezclada o aspirado de médula ósea a la solución de lisis.
3. Mezclar suavemente vertiendo de 10 a 15 veces. Posteriormente incubar a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante 5 min
4. Centrifugar a 3000 g durante 2 min. A continuación, retirar el sobrenadante dejando el sedimento de glóbulos blancos (WBC) y aproximadamente 200 µl de sobrenadante.
5. Verter suavemente el tubo en un pedazo de papel absorbente limpio durante al menos 10 seg. para drenar el sobrenadante.

6. Agitar en vórtex el tubo para suspender los glóbulos blancos en el sobrenadante restante
 7. Añadir 3 ml de solución de lisis celular a la suspensión celular, pipetear o agitar durante 5 seg.
 8. Agregar 1 ml de solución de precipitación de proteínas; agitar la muestra durante 20 seg. para precipitar las proteínas.
 9. Centrifugar a 3000 g durante 5 min.
 11. Añadir 3 ml de isopropanol a un tubo de centrifuga cónico limpio de 15 ml.
 12. Vertir el sobrenadante que contiene el ADN en el tubo de isopropanol
 13. Mezclar suavemente vertiendo 50 veces hasta que los hilos blancos de ADN formen un grupo visible.
 14. Pipetear suavemente el ADN y 500 µl de la solución de isopropanol en un nuevo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.
 15. Centrifugar a 13.000–16.000 g durante 1 min.
 16. Desechar con cuidado el sobrenadante y drenar el tubo invirtiéndolo sobre un papel absorbente limpio o pipeteando el isopropanol residual.
 17. Agregar 300 µl de etanol al 70% al tubo.
 18. Verter de cinco a diez veces para lavar el sedimento de ADN.
 19. Centrifugar a 13.000–16.000 g durante 1 min.
 20. Desechar suavemente el sobrenadante y drene el tubo invirtiéndolo sobre un papel absorbente limpio, o pipetear el etanol residual.
 21. Secar al aire el sedimento de ADN durante 5 min.
 22. Agregar 200 µl de solución de hidratación de ADN.
 23. Agitar 5 seg. para mezclar.
- Para su almacenamiento:
24. Incubar a 55–65 ° C durante 1–2 h para disolver el ADN.
 25. Incubar a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante la noche con agitación suave.
 26. Centrifugar la muestra y transfírela a un tubo de almacenamiento permanente (opcional)
 27. Almacenar el ADN a 2–8 ° C.

(Mullegama et al., 2018), (QIAGEN,2014)

Notas.

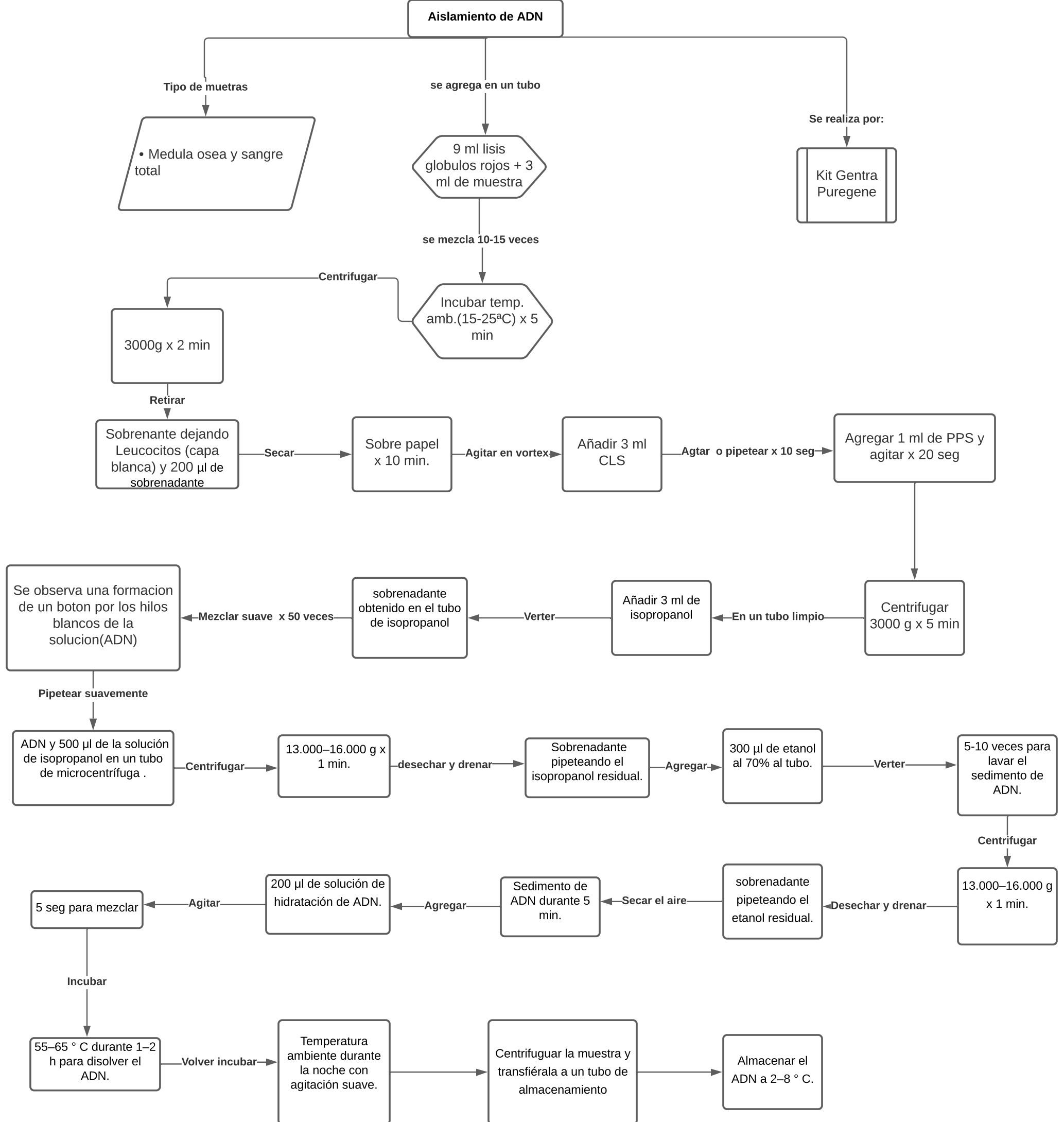
Este método está diseñado para purificar altos rendimientos de ADN de alta calidad, los rendimientos típicos de ADN de una variedad de fuentes de muestras, es decir, el rendimiento real obtenida dependerá del tipo de muestra, el tamaño del genoma del organismo y número de células de la muestra. El rendimiento también dependerá de la calidad de la que la muestra presente antes de iniciar el proceso.

El método es previsto para la purificación de ADN a partir de 10 ml de sangre completa. Los protocolos se pueden escalar para otros tamaños de muestra. Póngase en contacto con el servicio técnico de QIAGEN

El método esta optimizado para:

- Flujos de trabajo en los que es conveniente detenerse después de agregar la solución de lisis celular.
- Las muestras son estables en solución de lisis celular durante al menos 2 años a temperatura ambiente (15-25 ° C).
- Muestras que se han sometido a condiciones de almacenamiento desconocidas.
- Muestras de sangre almacenadas en condiciones óptimas.
- Flujos de trabajo que requieren el procesamiento de una gran cantidad de muestras.
- Flujos de trabajo en los que no es necesario detenerse después de agregar la solución de lisis celular.
- Purificación rápida de ADN de grandes muestras de sangre; El ADN se puede purificar a partir de 16 muestras en menos de 1 hora.
- Las proteínas precipitadas deben formar una pastilla apretada de color marrón oscuro. Si el sedimento de proteína no está apretado, repita el paso de agitación con vórtex, incube en hielo durante 5 minutos y repita la centrifugación.
- Asegúrese de que el gránulo de proteína no se desprenda durante el vertido y permanezca en el tubo original.
- Tenga cuidado de que el sedimento de ADN permanezca en el tubo.
- La cantidad esperada de ADN aislado con el kit de sangre Gentra Puregene es de 5 a 15 µg para 300 µl de sangre completa o de 50 a 150 µg para 3 ml de sangre completa. Los resultados más bajos o más altos que esto pueden deberse a la condición médica del paciente o la calidad de la muestra.

(Mullegrama et al., 2018), (QIAGEN,2014), (Tan & Yiap, 2013), (Ali et al., 2017).



+ Aislamiento de ADN para líquido de células cultivadas, tejido fresco / congelado y células bucales

Introducción y Fundamento

El kit QIAamp DNA Mini es un método rápido y eficiente para la purificación del ADN total para una PCR. El ADN total se puede purificar a partir de células cultivadas, tejidos y muestras forenses.

Los sencillos procedimientos de centrifugado y vacío QIAamp, que son ideales para el procesamiento simultáneo de varias muestras, producen ADN puro listo para la amplificación. Los kits QIAamp DNA Mini está diseñado para la purificación rápida de un promedio de 6 µg de ADN total (Ej., Genómico, viral, mitocondrial) células cultivadas que tienen un conjunto normal de cromosomas. En promedio, se pueden purificar hasta 30 µg de ADN a partir de 25 mg de diversos tejidos humanos.

El QIAamp DNA Mini Kit contiene proteinasa K, que es la enzima elegida para los tampones de lisis que contienen SDS; La actividad de la solución de proteinasa K es de 600 mAU, esta enzima su función es purificar el ADN metabolizando las proteínas que se encuentren en el medio. (QIAGEN, 2018)

La base de este proceso es la purificación en columnas, en el protocolo de centrifugado, las condiciones de amortiguación del lisado se ajustan para permitir la unión óptima del ADN a la membrana de la columna antes de que la muestra se cargue en la columna giratoria. El ADN se adsorbe en la membrana de sílice durante un breve paso de centrifugación o vacío. Las condiciones de sal y pH en el lisado garantizan que las proteínas y otros contaminantes, que pueden inhibir la PCR y otras reacciones enzimáticas posteriores, no se retengan en la membrana. (Ali et al., 2017).

El ADN unido a la membrana se lava en 2 etapas de centrifugación o vacío. El uso de 2 tampones de lavado diferentes, Buffer AW1 y Buffer AW2, mejora significativamente la pureza del ADN eluido. Las condiciones de lavado garantizan la eliminación completa de cualquier contaminante residual sin afectar la unión del ADN. Posteriormente, se eluye de la columna giratoria en forma concentrada en Buffer AE o en agua. (Alejos, 2010.)

Tiempo duración: 20-30 minutos.

Materiales

1. células cultivadas, tejido fresco / congelado o células bucales.
2. QIAamp® DNA Mini Kit.
 - (a) Tampón AL
 - (B) Tampón ATL (tampón de lisis tisular)
 - (C) Tampón AW1 (Tampón de lavado 1.
 - (D) Tampón AW2 (Tampón de lavado 2).
 - (E) Tampón AE.
 - (F) Columnas de centrifugado QIAamp®.
3. Proteinasa K.
4. Solución salina tamponada con fosfato (PBS).
5. Etanol al 100%.

Método de células cultivadas

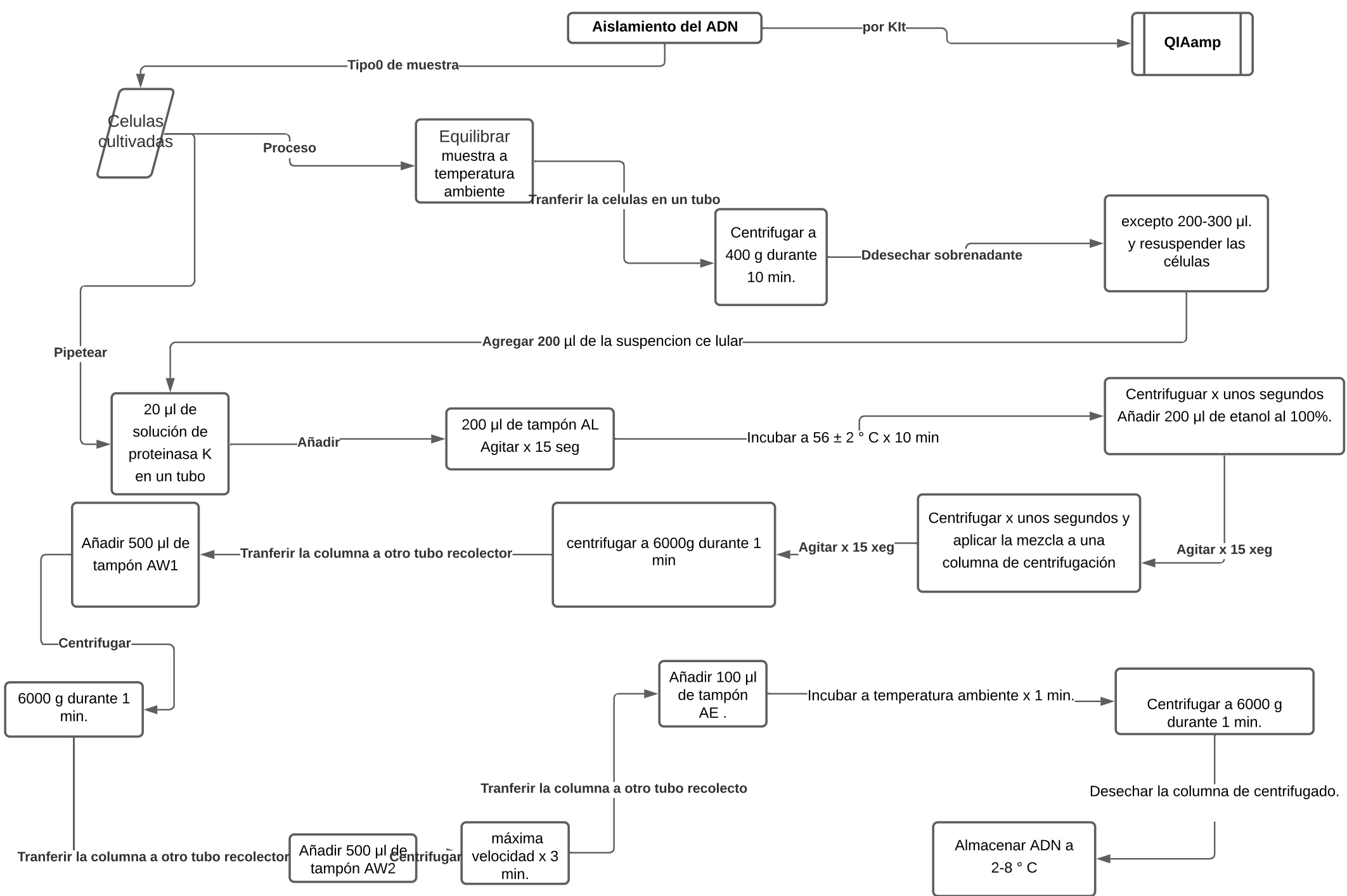
1. Equilibrar la muestra a temperatura ambiente (15–25 ° C)
2. Pipetear 20 µl de solución de proteinasa K en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
3. Transferir todas las células a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml por separado
4. Centrifugar a 400 g durante 10 min.
5. Retire y deseche todo el sobrenadante excepto 200-300 µl.
6. Resuspender las células en el sobrenadante.
7. Agregar 200 µl de la suspensión celular al tubo de microcentrífuga de 1.5 ml que contiene 20 µl de proteinasa K preparada en el paso 2.
8. Añadir 200 µl de tampón AL y agite en el vórtex durante 15 seg.
9. Incubar a 56 ± 2 ° C durante 10 min.
10. Centrifugar el tubo de microcentrífuga durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
11. Añadir 200 µl de etanol al 100%.
12. Agitar en el vórtex durante 15 seg y centrifugue durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
13. Aplicar con cuidado la mezcla a una columna de centrifugación QIAamp® en un tubo de recolección de 2 ml sin mojar el borde.
14. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000g durante 1 min.
15. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
16. Añadir 500 µl de tampón AW1 a la columna de centrifugado.
17. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.
18. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
19. Añadir 500 µl de tampón AW2 a la columna de centrifugado.
20. Cierre la tapa de la columna de centrifugado y centrifugue a máxima velocidad durante 3 min.
21. Transferir la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado.
22. Añadir 100 µl de tampón AE a la columna de centrifugado.
23. Incubar a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante 1 min.
24. Centrifugar a 6000 g durante 1 min.
25. Desechar la columna de centrifugado.
26. Almacenar ADN a 2-8 ° C

(QIAGEN, 2018), (Mullegama et al., 2018),

Notas:

- Asegurar de que no haya partículas residuales visibles y luego agite en vórtex 2-3 veces durante la incubación para dispersar la muestra.
- Las muestras pequeñas deben ajustarse a 200 μ l con PBS antes de cargarlas. Para muestras más grandes de 200 μ l, la cantidad de tampón de lisis y otros reactivos añadidos a la muestra antes la carga debe aumentarse proporcionalmente.
- Las muestras pequeñas deben ajustarse a 200 μ l con PBS antes de cargarlas. Para muestras más grandes de 200 μ l, la cantidad de tampón de lisis y otros reactivos añadidos a la muestra antes la carga debe aumentarse proporcionalmente.

(QIAGEN, 2018) (Tan & Yiap, 2013), (Ali et al., 2017).



De tejido fresco/congelado

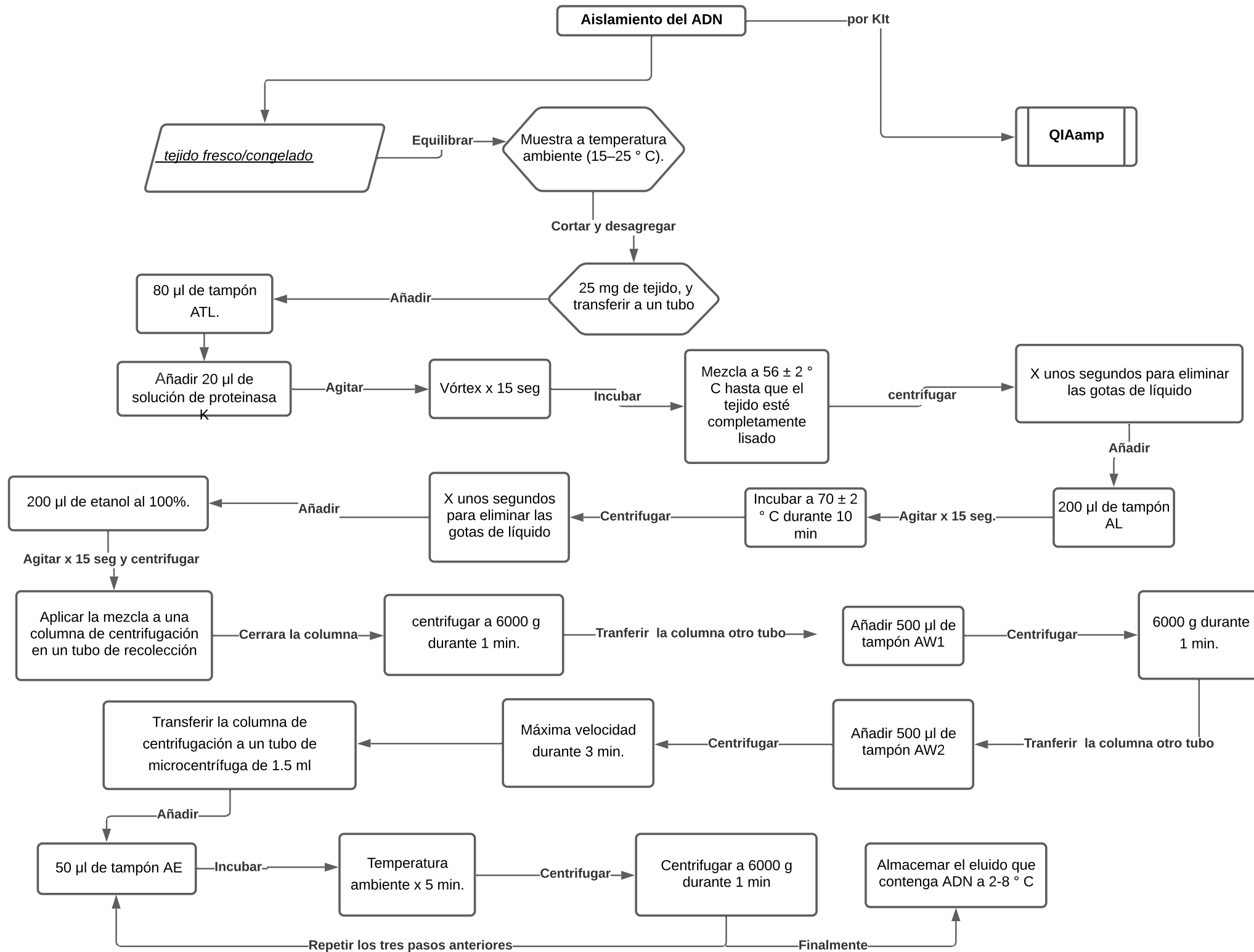
1. Equilibrar la muestra a temperatura ambiente (15–25 ° C).
2. Cortar y desagregar, hasta 25 mg de tejido, y transferir a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
3. Añadir 180 µl de tampón ATL.
4. Añadir 20 µl de solución de proteinasa K.
5. Agitar en el vórtex durante 15 seg.
6. Incubar la mezcla a 56 ± 2 ° C hasta que el tejido esté completamente lisado.
7. Centrifugar el tubo de microcentrífuga durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
8. Añadir 200 µl de tampón AL y agite en el vórtex durante 15 seg.
9. Incubar a 70 ± 2 ° C durante 10 min.
10. Centrifugar el tubo de microcentrífuga durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
11. Añadir 200 µl de etanol al 100%.
12. Agitar en el vórtex durante 15 seg y centrifugue durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
13. Aplicar con cuidado la mezcla a una columna de centrifugación QIAamp® en un tubo de recolección de 2 ml sin mojar el borde.
14. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.
15. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
16. Añadir 500 µl de tampón AW1 a la columna de centrifugado.
17. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.
18. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
19. Añadir 500 µl de tampón AW2 a la columna de centrifugado.
20. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a máxima velocidad durante 3 min.
21. Transferir la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado.
22. Añadir 50 µl de tampón AE a la columna de centrifugación.
23. Incubar a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante 5 min.
24. Centrifugar a 6000 g durante 1 min.
25. Repetir los pasos num. 22 - 24.
26. Desechar la columna de centrifugado.
27. Almacenar el eluido que contenga ADN a 2-8 ° C. (QIAGEN, 2018), (Mullegama et al., 2018)

Notas:

Aplicación del lisado a la columna de centrifugado requiere más de un paso de carga si aumenta el volumen de la muestra inicial. Las cantidades de Buffer AW1 y Buffer AW2 utilizadas en los pasos de lavado no es necesario aumentar.

En principio, es posible ampliar el protocolo de tejido. Los volúmenes de Buffer ATL y La proteinasa K utilizada debe aumentarse proporcionalmente, mientras que los volúmenes de lavado y los tampones de elución deben permanecer constantes. El usuario debe determinar la cantidad máxima de tejido utilizado. Es importante no sobrecargar la columna, ya que esto puede llevar a rendimientos más bajos de lo esperado. Se recomienda el uso de Proteinasas K con muestras de tejido.

(QIAGEN, 2018) (Tan & Yiap, 2013), (Ali et al., 2017).



De hisopo bucal

1. Colocar un hisopo bucal en un tubo de microcentrífuga de 2 ml.
2. Añadir 400 µl, si es de algodón y hisopo DACRON, o 600 µl, si es Omni Swab, de PBS al tubo que contiene el hisopo.
3. Añadir 20 µl de solución de proteinasa K.
4. Añadir 400 µl (algodón y hisopo DACRON) o 600 µl (Omni Swab) de tampón AL a la muestra.
5. Mezclar inmediatamente agitando con vórtex durante 15 seg.
6. Incubar la mezcla a 56 ± 2 ° C durante 10 min.
7. Centrifugar el tubo de microcentrífuga durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
8. Añadir 400 µl, si es algodón y hisopo DACRON, o 600 µl, si es Omni Swab, de etanol al 100% a la muestra.
9. Agitar en el vórtex durante 15 seg y centrifugue durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
10. Aplicar con cuidado 700 µl de la mezcla a una columna de centrifugación QIAamp® en un tubo de recolección de 2 ml sin mojar el borde.
11. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.
12. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
13. Aplicar hasta 700 µl de la mezcla restante a la columna de centrifugado en un tubo de recogida de 2 ml sin mojar el borde.
14. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.
15. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
16. Añadir 500 µl de tampón AW1 a la columna de centrifugado.
17. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.
18. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
19. Añadir 500 µl de tampón AW2 a la columna de centrifugado.
20. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a máxima velocidad durante 3 min.
21. Transferir la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado.
22. Añadir 50-100 µl de tampón AE a la columna de centrifugado.
23. Incubar 1 min a temperatura ambiente (15–25 ° C).
24. Centrifugar a 6000 g durante 1 min.

25. Deseche la columna de centrifugado.

26. Almacenar ADN a 2-8 ° C

(QIAGEN, 2018), (Mullegama et al., 2018),

Notas:

- Asegurar de que no haya partículas residuales visibles y luego agite en vórtex 2-3 veces durante la incubación para dispersar la muestra.
- Las muestras pequeñas deben ajustarse a 200 µl con PBS antes de cargarlas. Para muestras más grandes de 200 µl, la cantidad de tampón de lisis y otros reactivos añadidos a la muestra antes la carga debe aumentarse proporcionalmente.
- Las muestras pequeñas deben ajustarse a 200 µl con PBS antes de cargarlas. Para muestras más grandes de 200 µl, la cantidad de tampón de lisis y otros reactivos añadidos a la muestra antes la carga debe aumentarse proporcionalmente.
- (QIAGEN, 2018) (Tan & Yiap, 2013), (Ali et al., 2017).

Las indicaciones siguientes son para los tres tipos de muestras que se ocupan en este método.

Reactivos.

- Compruebe si hay precipitados en los tampones AL y ATL antes de usar. Si hay precipitados, disuélvalos incubándolos a 56 ± 2 ° C hasta que se disuelvan. Mezclar bien antes de usar. Almacenar a 15–25 ° C.
- Con el primer uso de Buffer AW1, agregue etanol (96–100%) en la cantidad indicada en la botella. Almacenar a 15–25 ° C.
- Con el primer uso de Buffer AW2, agregue etanol (96–100%) en la cantidad indicada en la botella. Almacenar a 15–25 ° C.
- No utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona.
- Asegúrese de que estén bien mezclados invirtiéndolos suavemente de 10 a 15 veces.

(QIAGEN, 2018)

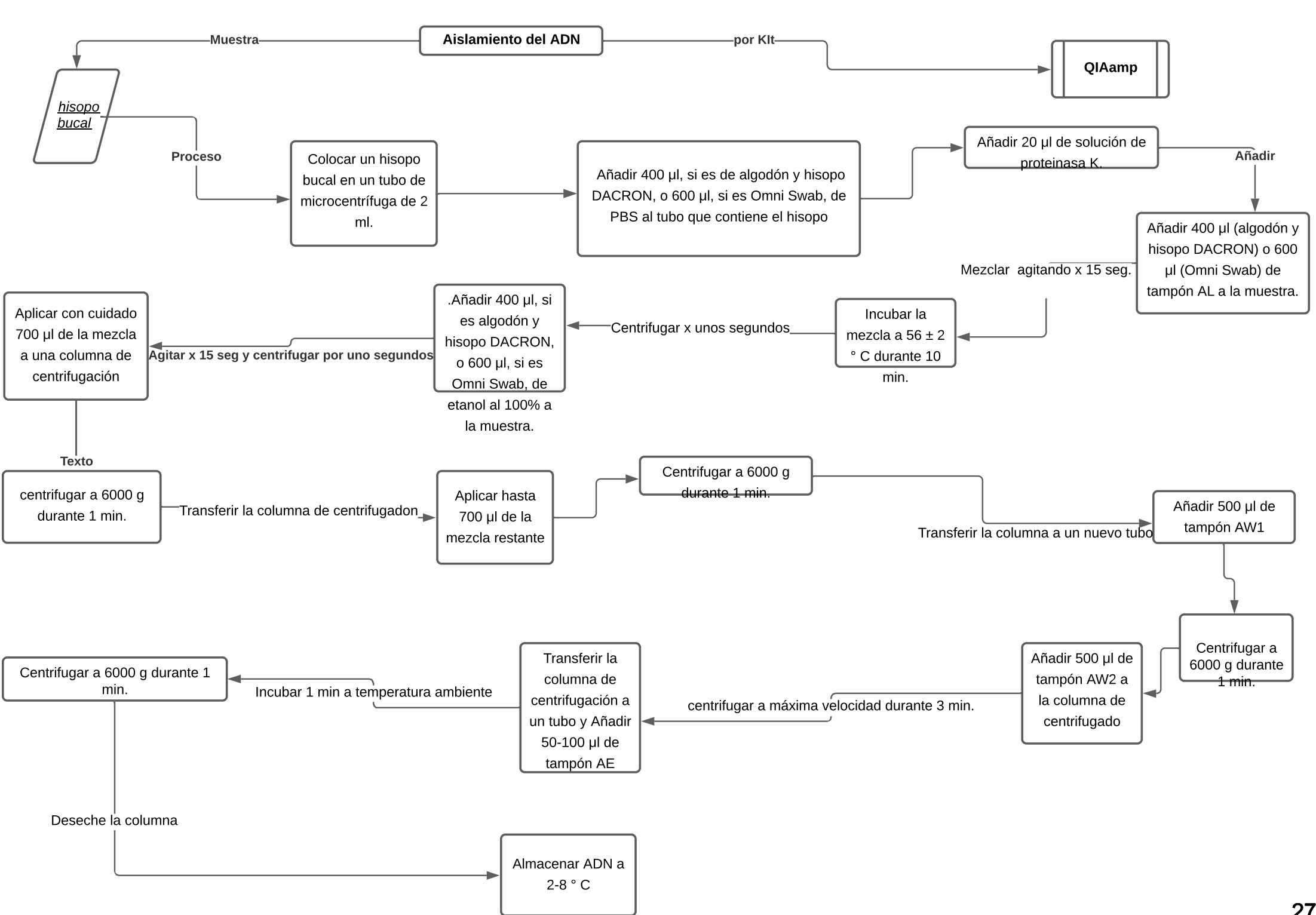
Manipulación de columnas QIAamp Mini

Debido a la sensibilidad de las tecnologías de amplificación de ácidos nucleicos, es necesario tomar precauciones al manipular las columnas QIAamp Mini para evitar la contaminación cruzada entre las preparaciones de muestras:

- Aplique con cuidado la muestra o solución a la columna QIAamp Mini. Pipetee la muestra en la columna QIAamp Mini sin mojar el borde de la columna.
- Cambie las puntas de las pipetas entre todas las transferencias de líquido. El uso de puntas de pipeta con barrera de aerosol.
- Evite tocar la membrana QIAamp con la punta de la pipeta.
- Después de todos los pasos de agitación, centrifugue brevemente los tubos de microcentrífuga para quitar las gotas del interior de la tapa.
- Use guantes durante todo el procedimiento. En caso de contacto entre guantes y muestrear, cámbiese los guantes inmediatamente.
- Las columnas QIAamp Mini caben en la mayoría de los tubos de microcentrífuga estándar de 1,5 a 2 ml.
- La centrifugación de las columnas QIAamp Mini se realiza a 6000 x g (8000 rpm) para reducir ruido de centrifugado.

- Centrifugar las columnas QIAamp Mini a máxima velocidad no afectará al ADN. La centrifugación a velocidades más bajas también es aceptable, siempre cuando la solución se transfiere a través de la membrana QIAamp.
- Al preparar ADN de capa leucocitaria o linfocitos, se recomienda la centrifugación a máxima velocidad para evitar obstrucciones.
- Todos los pasos de centrifugación deben realizarse a temperatura ambiente (15–25 ° C).
- Coloque la columna QIAamp Mini en un nuevo tubo de recolección. Desechar el filtrado y el tubo de recogida. Tenga en cuenta que el filtrado puede contener residuos peligrosos y debe desecharse de forma adecuada.
- Abra solo una columna QIAamp Mini a la vez y tenga cuidado de no generar aerosoles.
- Para un procesamiento paralelo eficiente de varias muestras, llene una rejilla con tubos de recolección al que se pueden transferir las columnas QIAamp Mini después de la centrifugación.

(QIAGEN, 2018)



+ Procedimiento de aislamiento de ADN para saliva

Introducción y Fundamento

El medio de transporte Orange -DX permite llevar a cabo la homogenización de la muestra por el líquido de transporte para el hisopo que permite un pretratamiento de la muestra para permitir efectividad en el proceso de lisis celular para la extracción del material genético. (DNA GENOTEK, 2012)

El reactivo prepIT-L2 nos va permitir la lisis celular con agentes caotrópicos que permiten disolver la membrana celular, así como inhibidores para inactivar las enzimas que degradan el ADN, posteriormente se utiliza la fuerte tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para separarlos en medios acuosos, mientras que las proteínas y los lípidos se separan en solventes orgánicos. Finalmente se precipita con etanol el ADN. (Alejos, 2010.)

Duración: 3 horas

Materiales

1. 2 ml de saliva.
2. Kit de recolección de saliva Oragene®-DX
3. Kit de extracción de ADN prepIT®-L2P
4. Etanol al 100%.
5. Etanol al 70%.
6. Tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0).

Métodos

1. Mezclar la muestra de saliva en el tubo de recolección de saliva Oragene®-DX invirtiéndolo y agitar suavemente durante unos segundos.
2. Incubar la muestra a 50 ° C durante un mínimo de 2 h
3. Verter la muestra de saliva diez veces.
4. Transferir 500 µl de la muestra mezclada a un tubo de microcentrífuga.
5. Añadir 20 µl de prepIT-L2P al tubo.
6. Agitar en el vórtex durante 10 s.
7. Incubar en hielo durante 10 min.
8. Centrifugar a 15.000 g durante 10 min.
9. Transferir con cuidado 500 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga
10. Agregar 600 µl de etanol al 100% al tubo.
11. Verter suavemente diez veces.
12. Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante 10 minutos.
13. Colocar el tubo en la microcentrífuga con la parte de la bisagra de la tapa apuntando en dirección opuesta al centro del rotor.
14. Centrifugar a 15.000 g durante 2 min.
15. Retirar con cuidado y desechar el sobrenadante.

16. Añadir con cuidado 250 µl de etanol al 70%.
17. Dejar reposar la muestra durante 1 minuto a temperatura ambiente (15–25 ° C)
18. Centrifugar el tubo y eliminar el etanol residual con una pipeta de 200 µl.
19. Agregar 50 µl de tampón TE y agitar en el vórtex durante 15 seg para disolver el sedimento de ADN.
20. Incubar durante la noche a temperatura ambiente (15–25 ° C).
21. Agitar en el vórtex durante 30 s.
22. Almacenar el ADN a 2–8 ° C.

(DNA GENOTEK, 2012), (Mullegama et al., 2018)

Notas:

- El tratamiento térmico es fundamental para asegurar que el ADN se libere adecuadamente y las nucleasas se inactiven permanentemente. El resto de la muestra puede almacenarse a temperatura ambiente (15–25 ° C) o congelarse (–15 ° C a –20 ° C) hasta por 1 año.
- La muestra se volverá turbia a medida que precipiten las impurezas y los inhibidores.
- Si el sedimento se altera accidentalmente durante la transferencia, el tubo debe volver a centrifugarse a 15.000 × g durante 5 minutos antes de intentar transferir el sobrenadante nuevamente.
- El ADN puede aparecer como un coágulo de fibras de ADN o como un precipitado fino, dependiendo de la cantidad de ADN en la muestra. Incluso si no se observa ningún coágulo, se recuperará el ADN.
- Es importante eliminar todo el etanol de la muestra después del lavado. El arrastre de etanol puede afectar el rendimiento de los ensayos posteriores.
- Se puede efectuar la transferencia vertiendo o pipeteando con pipeta de vidrio o de plástico
- Incubar en hielo durante 10 minutos se puede sustituir por temperatura ambiente, pero será menos eficaz para eliminar impurezas
- En el paso 9; dejar un volumen pequeño del sobrenadante para evitar la agitación del sobrenadante (contiene impurezas).

(DNA GENOTEK, 2012), (Mullegama et al., 2018)

Aislamiento de ADN

Tipo de muestras

• Saliva

Proceso

Mezclar la saliva en el tubo de recolección ORAGENE-DX

Incubar la muestra a 50 ° C x 2 h

Transferir 500 µl de la muestra mezclada a un tubo

Se realiza por:

Oragene® -DX y prepIT® -L2P

Añadir

20 µl de prepIT-L2P al tubo

Agitar en el vórtex x 10 s

Incubar en hielo x 10 min.
Centrifugar a 15.000 g durante 10 min

Transferir con cuidado 500 µl del sobrenadante

Agregar 600 µl de etanol al 100% al tubo

Agregar

600 µl de etanol al 100% al tubo

verter 10 veces

Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente x 10 min

Centrifugar a 15.000 g durante 2 min

Desechar el sobrenadante. y añadir con cuidado 250 µl de etanol al 70%.

Dejar reposar la muestra durante 1 min.

Centrifugar el tubo y eliminar el etanol residual

Agregar

50 µl de tampón TE y agitar en el vórtex x 15 seg

Incubar durante la noche

Agitar x 30 s y almacenar el ADN a 2-8 ° C.

+ Aislamiento de ADN procedimiento de tejido FFPE de ADN a partir de tejidos FFPE

Introducción y Fundamento

El kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue es un sistema que utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice para el aislamiento y la purificación de ADN genómico procedente de muestras biológicas fijadas en formalina e incorporadas en parafina (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE). Se ha diseñado para su empleo en técnicas de biología molecular para diagnóstico in vitro, cuyo fin es la preparación manual de muestras y no proporciona resultados de ensayo cualitativos ni cuantitativos. (QIAGEN, 2017)

Este kit es utilizado para la purificación de ADN procedente de secciones tisulares FFPE combinando las propiedades de unión selectiva de una membrana de gel de sílice con volúmenes de elución. Las condiciones de lisis permiten una purificación eficiente del ADN genómico procedente de secciones tisulares FFPE sin necesidad de incubación durante toda la noche. La incubación a una temperatura elevada una vez que la digestión en proteinasa K elimina parcialmente la reticulación de la formalina en el ADN liberado, lo que puede mejorar potencialmente los resultados, así como el rendimiento del ADN en los ensayos posteriores. Debe tenerse en cuenta que el ADN aislado de las muestras FFPE normalmente presenta un peso molecular inferior al del ADN procedente de muestras frescas o congeladas. El grado de fragmentación depende del tipo y de la antigüedad de la mezcla, así como de las condiciones empleadas para la fijación. (QIAGEN, 2017)

Tiempo duración: 2 horas y 30 minutos aproximadamente.

Materiales

1. Tejido FFPE.
2. QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit
 - (a) Tampón AL
 - (B) Tampón ATL (tampón de lisis tisular).
 - (C) Tampón AW1 (Tampón de lavado 1)
 - (D) Tampón AW2 (Tampón de lavado 2).
 - (E) Tampón ATE.
 - (F) Columnas de centrifugado QIAamp®.
3. Xileno (ACS, ≥98,5% de xilenos).
4. Etanol al 100% (prueba 200)

Métodos

1. Raspar el tejido de los portaobjetos con una hoja o bisturí estéril de un solo filo.
2. Transferir el tejido a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml.
3. Agregar 1 ml de xileno a la muestra.
4. Agitar con vórtex para eliminar la parafina del tejido.
5. Centrifugar la muestra a máxima velocidad durante 2 min.
6. Eliminar el sobrenadante pipeteando.
7. Agregar 1 ml de etanol al 100% a la muestra.
8. Agitar en vórtex durante 10 seg.
9. Centrifugar la muestra a máxima velocidad durante 2 min.
10. Eliminar el sobrenadante pipeteando.
11. Centrifugar brevemente el etanol residual y retirar con una punta de pipeta de 100 µl.
12. Dejar que el sedimento de la muestra se seque al aire.
13. Añadir 180 µl de tampón ATL y 20 µl de solución de proteinasa K.
14. Agitar en el vórtex durante 15 seg.
15. Incubar la mezcla a 56 ± 2 ° C durante 1 h.
16. Centrifugar el tubo de microcentrífuga durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
17. Incubar la muestra a 90 ± 2 ° C durante 1 h.
18. Centrifugar el tubo de microcentrífuga durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
19. Añadir 200 µl de tampón AL y agite en el vórtex durante 15 seg.
20. Añadir 200 µl de etanol al 100%.
21. Agitar en el vórtex durante 15 seg y centrifugar durante unos segundos para eliminar las gotas de líquido del interior de la tapa.
22. Aplicar con cuidado la mezcla a una columna de centrifugación QIAamp® en un tubo de recolección de 2 ml sin mojar el borde.
23. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.
24. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
25. Añadir 500 µl de tampón AW1 a la columna de centrifugado.
26. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.
27. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
28. Añadir 500 µl de tampón AW2 a la columna de centrifugado.
29. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 6000 g durante 1 min.

30. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.

31. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a máxima velocidad durante 2 min.

32. Transferir la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado.

33. Añadir 200 µl de tampón ATE a la columna de centrifugado.

34. Incubar 5 min a temperatura ambiente (15-25 ° C).

35. Centrifugar a máxima velocidad durante 1 min.

36. Almacenar el ADN a 2-8 ° C

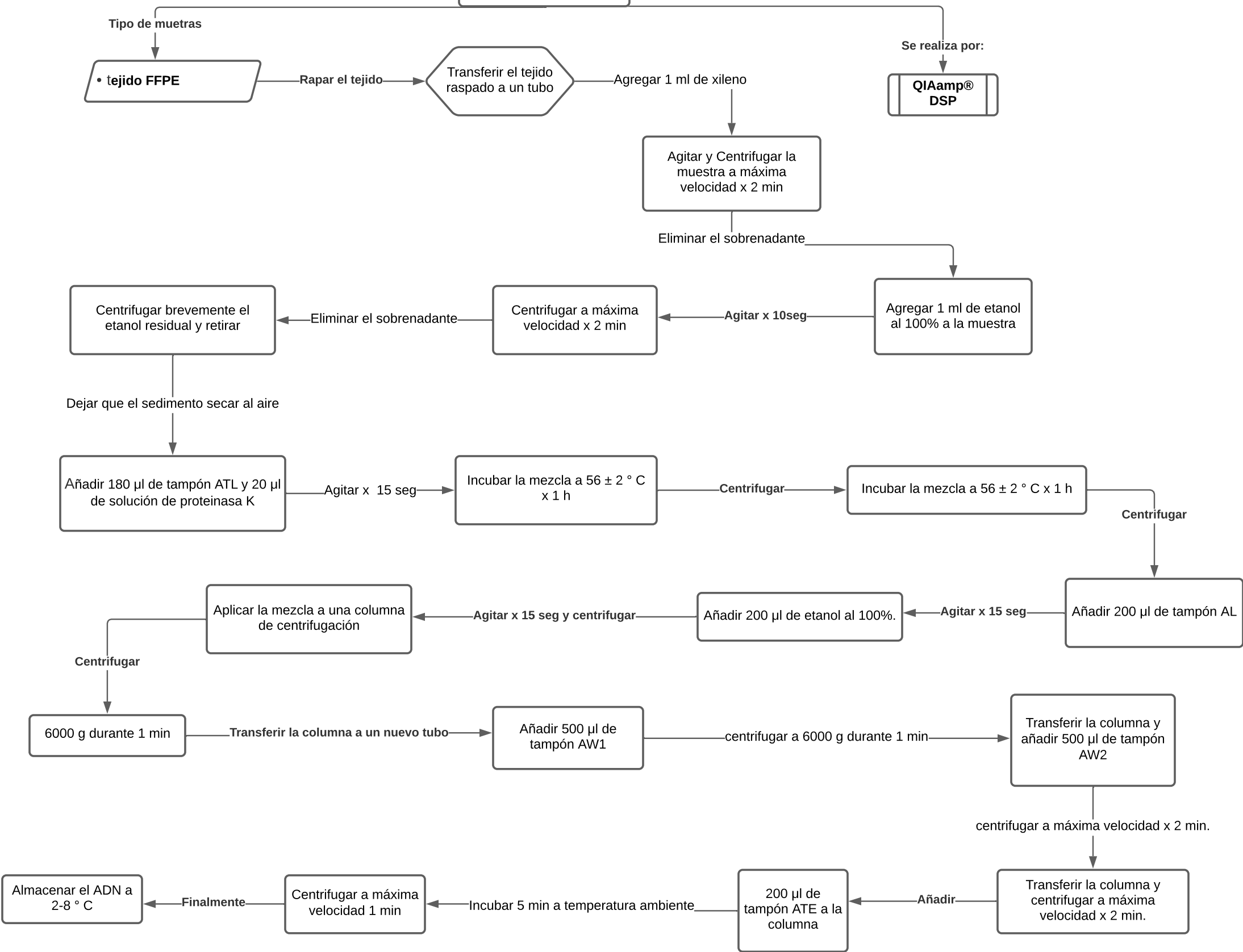
(QIAGEN, 2017), (Mullegama et al., 2018)

Notas:

- Al manipular los reactivos y las muestras, utilice siempre guantes de látex o de vinilo
- Las soluciones tampón sin usar, los líquidos y los restos de muestras deberán desecharse
- Si utiliza su propio material plástico, se recomienda el uso de tubos cónicos desechables de polipropileno de baja unión libres de ADNasa/ARNasa,
- Realizar todos los pasos de la centrifugación a temperatura ambiente (15-25 °C).
- El paso involucra xileno y debe realizarse en la campana extractora de seguridad.
- No retirar nada del pellet. Desechar los desechos de xileno en una botella de desechos designada.
- Asegurar de que no se vean partículas residuales. Agitar en el vórtex 2-3 veces por hora durante la incubación para dispersar la muestra.
- No dejar la muestra a 90 ° C durante más de 1 h.
- Asegurar de que se elimine todo el búfer de la columna.
- El rendimiento del kit se ha establecido utilizando tejidos fijados en formalina e incorporados en parafina (tejidos FFPE) para el aislamiento de ADN genómico.

(QIAGEN, 2017), (Mullegama et al., 2018)

Aislamiento de ADN



+ Aislamiento de ADN mediante perlas magnéticas a partir de tejidos, células cultivadas, sangre periférica y saliva

Introducción y Fundamento

La extracción de ácidos nucleicos (ARN y ADN), mediante el método de perlas magnéticas se basa principalmente en hibridación complementaria entre el ácido nucleico y las perlas, para su posterior aislamiento medido por campos magnéticos.

El proceso consta de 3 fases: unión, lavado y elución. A través de la unión selectiva de ADN en medios saturados con sales y su recuperación se lleva a cabo por un imán.

Este sistema tiene la principal ventaja que nos permite un aislamiento, extracción y purificación de ADN o ARN con un rendimiento superior al 90% con mucho menos esfuerzo que los métodos manuales o convencionales. (Ali et al., 2017) (Orfao & Morent, 2011)

Dentro de las aplicaciones posteriores que requieren moléculas de ácidos nucleicos puros, muchas de ellas no se pueden llevar a cabo con el material de muestra crudo, debido a la cantidad de contaminantes celulares (proteínas o carbohidratos), que acompañan a la muestra. Frente a esto el método de perlas magnéticas es la opción más eficaz, fiable y reproducible para el aislamiento de ADN y ARN. (Ali et al., 2017)

Muestras:

Sangre periférica 5-10 ml

Células mononucleares 0,1-2 ml de medio.

Cultivos celulares 1.2×10^7 células.

Saliva 2 ml de saliva

Tejido fresco congelado 10 mg

Materiales

1. Buffer de lisis
2. Buffer con perlas magnéticas
3. Buffer de elución
4. Buffer de lavado 1
5. Buffer de lavado 2
6. Barra magnética

Métodos

1. Añadir buffer de lisis a la muestra junto con la proteasa reconstituida e incubar por 5 min.
2. Añadir Buffer con perlas magnéticas, agitar e incubar por 5-10 min.
3. Colocar el tubo con la solución anterior a una barra magnética por 2-4 min, eliminar la solución
4. Retirar del separador magnético y añadir buffer de lavado 1. Agitar la mezcla.
5. Aplicar de nuevo el separador magnético durante 1-3 minutos y se elimina el tampón de lavado.
6. Realizar dos nuevos lavados siguiendo el mismo procedimiento y eliminar el tampón de lavado, en el último paso no se retira el tubo del separador magnético.
7. Añadir buffer de lavado e incubar por 2-1 minuto. Eliminar la solución de lavado.
8. Eliminar la solución de lavado y añadir el Buffer de elusión.
9. Retirar el separador para mezclar bien las esferas con el tampón de resuspensión de ADN.
10. Incubar durante 10 minutos con agitación a temperatura ambiente para eluir el ADN de las esferas. (Esta incubación puede realizarse a 55°C para optimizar la elución del ADN.)
11. Aplicar la barra magnética al tubo durante aproximadamente 3 minutos para separar las esferas magnéticas de la suspensión de ADN.
12. La solución de ADN se pasa a un tubo limpio con cuidado de no arrastrar las esferas magnéticas. Si aún se observase presencia de esferas magnéticas en la solución de ADN se repite de nuevo este último paso

(Orfao & Morent, 2011)

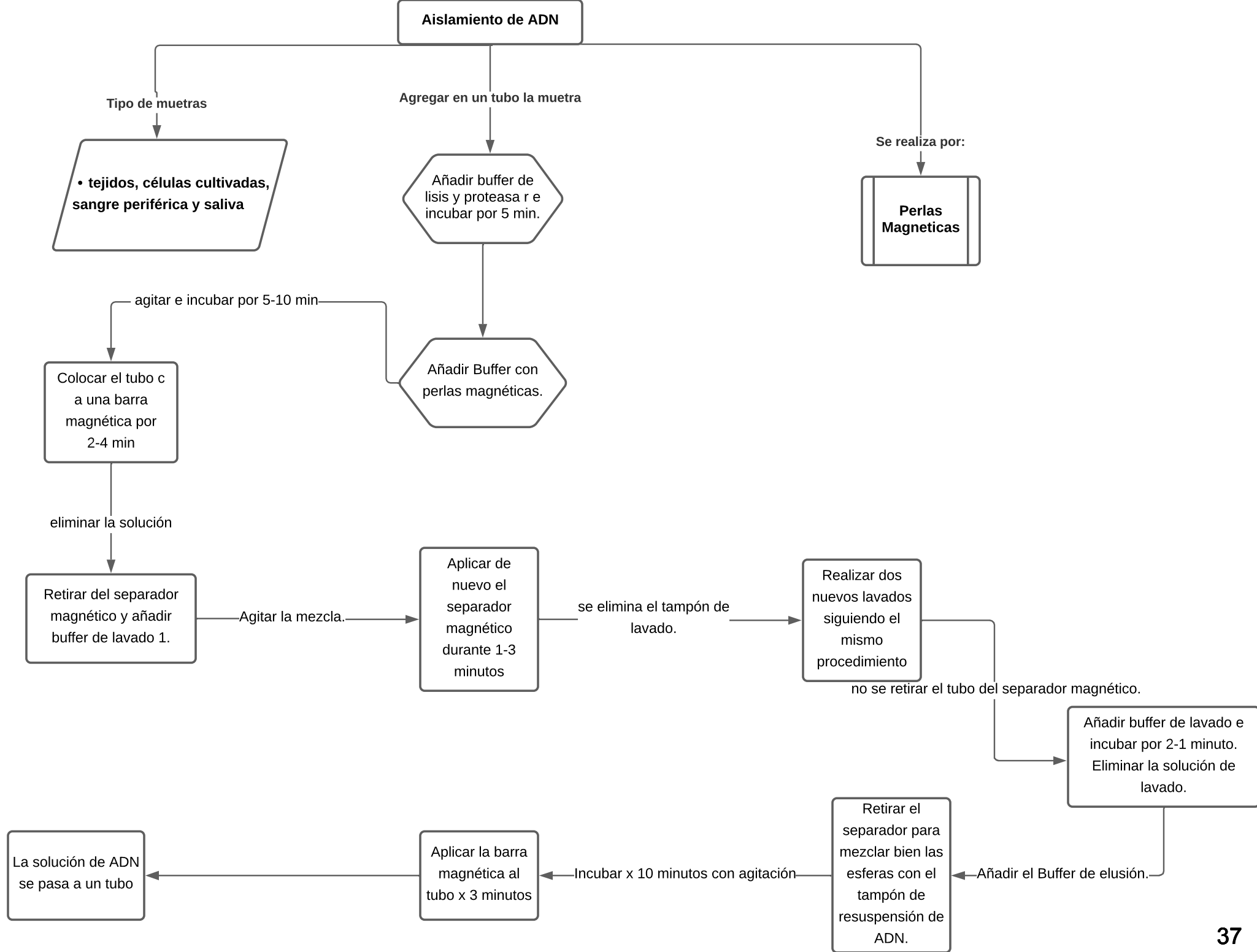
Notas:

En tejidos, se añade proteinasa K en una concentración final de 250 µg/ ml de buffer de lisis y se lleva a cabo una incubación a 56°C con agitación a 600 rpm hasta que la lisis de las células sea completa. En muestras de saliva con preservante Oragene® no se adiciona el buffer de lisis, pero la muestra con el preservante se incuba durante toda la noche a 55°C.

Tiempos más prolongados de incubación o la dispersión de las bolas magnéticas durante la misma pueden dar lugar a un rendimiento más bajo reflejado en la obtención de una menor cantidad de ADN. *(Orfao & Morent, 2011)*

Se aplica al tubo que contiene la mezcla de lisado y esferas un separador magnético durante 2-4- minutos de modo que las esferas magnéticas unidas al ADN queden aglutinadas en la parte del tubo en contacto con el separador magnético y el resto de la solución es eliminada.

(Orfao & Morent, 2011)



Métodos para extracción de células vegetales

-Protocolo CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) a partir de tejido vegetal.

Introducción y fundamento

Uno de los métodos que se utilizan para extraer ADN de plantas y alimentos derivados de vegetales utiliza CTAB que es la sustancia adecuada para procesar tejidos con una alta concentración de polisacáridos y polifenoles. Se ha utilizado de manera efectiva en diversas especies de plantas, bacterias, hongos, líquenes. (Alejos, 2010)

La composición básica del tampón de extracción de CTAB incluye CTAB al 2% a pH alcalino, pero, como muchos otros protocolos de extracción, el CTAB se ha modificado de acuerdo con la necesidad de cada muestra. CTAB actúa precipitando ácidos nucleicos y polisacáridos ácidos en soluciones de baja fuerza iónica, mientras que las proteínas y los polisacáridos neutros permanecen en solución. A continuación, el complejo precipitado de CTAB-ácido nucleico se solubiliza a altas concentraciones de sal, dejando los polisacáridos ácidos en el precipitado. Durante las etapas de precipitación y lavado, el método CTAB utiliza varios disolventes orgánicos y alcoholes como fenol, cloroformo, alcohol isoamílico y mercaptoetanol. El principal inconveniente de este procedimiento es que lleva mucho tiempo y utiliza productos químicos tóxicos como el fenol y el cloroformo. (Ali et al., 2017)

En la actualidad algunos laboratorios, que procesan un alto número de muestras, se siguen utilizando ya que permite obtener ADN de alta calidad eliminando los inhibidores que afectan la PCR; además de ser un método económico y fácil de estandarizar. (Tan & Yiap, 2013)

Duración: 3 horas aproximadamente

Muestra

- 100 mg de tejido vegetal

Materiales

1. Termo para nitrógeno líquido
2. Morteros y pistilos
3. Espátulas
4. Tijeras o bisturí
5. Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml estériles
6. Gradilla para tubos de 1.5 o 2 ml
7. Espátulas
1. Nitrógeno líquido (CAS N° 7727-37-9)
2. Proteinasa K (CAS N° 39450-01-6)
3. Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8
4. Buffer de extracción CTAB 2X
5. Solución Fenol: Cloroformo: isoamílico 25:24:1
6. Acetato de amonio 10 M
7. Etanol al 70 %

Método

1. Mezclar 100 mg de tejido previamente pulverizado con nitrógeno líquido con 1 ml de CTAB 2X, precalentado a 55 °C, en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml.
2. Mezclar por inversión e incubar 5 min. a temperatura ambiente.
3. Incubar 5 min. en hielo.
4. Agregar 20 µl de RNAsa A, mezclar por inversión e incubar por 20 min. a 37 °C. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces.
5. Agregar 10 µl de proteinasa K, mezclar por inversión e incubar a 60 °C por 20 min. Durante la incubación invertir los tubos dos o tres veces.
6. Incubar 5 min en hielo.
7. Agregar 600 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y agitar por inversión.
8. Centrifugar a 10,000 rpm a 8 °C, por 12 min.
9. Recuperar con cuidado 200 µl del sobrenadante y ponerlo en un tubo para microcentrífuga nuevo de 1.5 ml. Si el sobrenadante se encuentra turbio, será necesario repetir los pasos del siete al nueve.
10. Agregar 50 µl de acetato de amonio 10 M y mezclar por inversión varias veces.
11. Agregar 500 µl de isopropanol frío (a -20 °C) y mezclar por inversión varias veces.
12. Mantener la mezcla a -20°C durante 2 hrs, para favorecer la precipitación de ADN.
13. Centrifugar a 10,500 rpm a 8 °C, por 5 min.
14. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.
15. Agregar 1 ml de etanol al 70 % frío (a -20 °C).
16. Mezclar por inversión hasta observar que el botón se desprende del microtubo.
17. Dejar reposar 5 min. a temperatura ambiente.
18. Centrifugar a 10,000 rpm a 8 °C, por 5 min.
19. Eliminar el sobrenadante cuidando no desprender el botón de ADN.
20. Colocar los tubos para microcentrífuga de 1.5 ml en el concentrador de vacío a 55°C por 10 min para secar el ADN. Si no se cuenta con un concentrador de vacío se pueden dejar los tubos abiertos hasta que se evapore el etanol; cubrirlos con una toalla de papel para que no se contaminen.
21. Revisar que el botón de ADN se encuentra completamente seco; en caso de no estarlo repetir el paso 20 durante el tiempo que sea necesario
22. Rehidratar el ADN en 200 µl de buffer TE 1X o agua inyectable. Si el botón de ADN es pequeño se puede hidratar con 50 o 100 µl.

(Alejos, 2010)

Notas:

- Las modificaciones al protocolo CTAB han implicado la adición de proteinasa K y mercaptoetanol al tampón CTAB y el uso de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25: 24: 1) para purificación adicional para la purificación de la muestra, se más eficaz la separación de proteínas, lípidos y azúcares.
- Existen varias versiones o modificaciones del protocolo CTAB, es importante señalar que existen diferencias en las concentraciones de los componentes del tampón de extracción de CTAB utilizados para las diferentes versiones que va depender del origen y composición de la muestra. Otra cuestión importante por los solventes y reactivos ocupados se necesitan una mejor purificación de la muestra porque pueden interferir a los métodos moleculares posteriores, por consecuencia se obtiene un ADN más puro.

(Alejos, 2010) (Demeke & Jenkins, 2009)

Soluciones

Buffer Tris-HCl 100 mM pH 8

Dentro de la campana de extracción, disolver en 65 ml de agua desionizada 0.605 g de Tris-HCl. Agregar HCl al 0.1 N, agitando constantemente hasta ajustar el pH a. Aforar a un volumen de 100 ml con agua desionizada. Mantener a temperatura ambiente.

Buffer de extracción CTAB 2X

1.4 M de NaCl (8.181 g) 20 mM de EDTA (0.744 g), 2 % P/V de CTAB (2 g). Disolver lo anterior en 75 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 8 en un agitador termomagnético hasta que las sustancias se disuelvan completamente. Agregar 300 µl de 2-β-mercaptoetanol en la campana de extracción ya que este compuesto es muy volátil y tóxico. Finalmente, aforar a un volumen de 100 ml con la solución de Tris-HCl previamente utilizada. Mantener a temperatura ambiente y antes de iniciar el proceso caliente a 55 °C.

Solución Fenol: Cloroformo: isoamílico 25:24:1

Mezclar en la campana de extracción 50 ml de fenol, 48 ml de cloroformo y 2 ml de alcohol isoamílico. Mantener almacenado a -20°C.

Acetato de amonio 10 M

Disolver en 5 ml de agua desionizada, 7.71 g de acetato de amonio y aforar a 10 ml con agua desionizada. Mantener a temperatura ambiente.

Etanol al 70 %

Por cada 70 ml de etanol absoluto, agregar 30 ml de agua desionizada y mezclar. Mantener la solución a -20°C.

(Alejos, 2010)

Aislamiento de ADN

Tipo de muestras

• tejido fresco / congelado de origen vegetal

se agrega en un tubo

Mezclar 100 mg de tejido previamente pulverizado con nitrógeno líquido con 1 ml de CTAB 2X, precalentado a 55 °C, en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml.

Se realiza por:

CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio)

Incubar 5 min. en hielo

Agregar 20 µl de RNAsa A, mezclar por inversión e incubar por 20 min. a 37 °C.

Mezclar por inversión e incubar 5 min. a temperatura ambiente

invertir los tubos dos o tres veces

Agregar 10 µl de proteinasa K, mezclar por inversión e incubar a 60 °C por 20 min

invertir los tubos dos o tres veces

Incubar 5 min en hielo

Agregar 600 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y agitar por inversión.

Centrifugar a 10,000 rpm a 8 °C, por 12 min.

Recuperar 200 µl del sobrenadante y ponerlo en un tubo para microcentrífuga nuevo de 1.5 ml.

Eliminar cuidadosamente el sobrenadante.

Centrifugar a 10,500 rpm a 8 °C, por 5 min.

Mantener la mezcla a -20°C durante 2 hrs, para favorecer la precipitación de ADN.

Agregar 500 µl de isopropanol frío (a -20 °C) y mezclar por inversión varias veces.

Agregar 50 µl de acetato de amonio 10 M y mezclar por inversión varias veces.

Agregar 1 ml de etanol al 70 % frío (a -20 °C).

Mezclar por inversión hasta observar que el botón se desprende del microtubo.

Reposar 5 min...

Centrifugar a 10,000 rpm a 8 °C, por 5 min.

Eliminar el sobrenadante

Colocar los tubos para microcentrífuga de 1.5 ml en el concentrador de vacío a 55°C por 10 min para secar el ADN.

Revisar que el botón de ADN se encuentra completamente seco

Rehidratar el ADN en 200 µl de buffer TE 1X o agua inyectable.

Métodos para extracción de células procariontes

+ Extracción de ADN en bacterias

Introducción y fundamento

Toda la información genética esencial para la vida de la bacteria está contenida en una única molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena y circular, cerrado por enlace covalente. Dicha molécula se denomina cromosoma bacteriano. Muchas bacterias poseen además ADN extra cromosómico, también circular y cerrado, denominado ADN plasmídico por estar contenido en los plásmidos. Para obtener el material genético se utilizará el método siguiente. (BIOTED, 2015)

El TE es una solución de EDTA y tris que permite lavar la muestra de batería de cationes divalentes y exceso de medio de cultivo, posteriormente se agrega SDS; un detergente que lisa la membrana bacteriana, mientras que la proteinasa K digiere proteínas. Posteriormente, se hace pasar la solución a través de agujas para romper complejos macromoleculares en los que se encuentra atrapado el DNA. Con esta acción parte del DNA se rompe, aunque el daño no es suficiente para interferir con su análisis. (CONOGASI, 2017)

Como consecuencia, se adiciona la solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1), la mezcla fenol-cloroformo elimina el agua contenida en la fase orgánica y el alcohol isoamílico ayuda a la separación de la fase orgánica de la acuosa. Con varios lavados con la solución anterior se obtiene diferentes se obtiene un ADN puro.

El DNA es insoluble en etanol y el acetato favorece la precipitación de los ácidos nucleicos con el etanol al 70 % se lava el exceso de sal contenida en la muestra

Duración: 1 hora y 35 minutos

Materiales

1. Tris 1M pH 8.0
2. EDTA 0.25M pH 8.0
3. TE (tris y EDTA) 10/1 pH 8.0
4. TE 50/20 pH 8.0
5. SDS 10%
6. RNasa [50 µg/ml]
7. Acetato de potasio (CH₃CO₂K) 3M
8. NaOH 1M
9. Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
10. Etanol absoluto

Métodos

1. Inocular 5 ml de medio de cultivo con la cepa de interés e incubar 12 h a 300 rpm
2. Centrifugar el cultivo a 10 000 rpm durante 1 min. Descartar el sobrenadante
3. Resuspender la pastilla celular en 1 ml de solución TE 50:20, pH=8.
4. Centrifugar a 10 000 rpm durante 1 min y descartar el sobrenadante
5. Resuspender la pastilla celular en 0.4 ml de TE 50:20
6. Adicionar 50 µl de SDS al 10% y 50 µl de proteinasa K a 2.5 mg/ml. Mezclar por inversión varias veces e incubar a 37 °C durante 1 h
7. Transferir el lisado claro a una jeringa (con aguja del No. 20) y hacerlo pasar a través de la aguja 5 veces
8. Repetir la operación anterior pero esta vez usando una aguja del No. 25.
9. Adicionar 0.5 ml de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (24:24:1) y mezclar
10. Centrifugar a 10 000 rpm durante 10 min. Recuperar la fase acuosa, repetir la operación anterior (paso 9) y centrifugar nuevamente (10 000 rpm, 10 min)
11. Recuperar la fase acuosa y adicionar 2 volúmenes de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1).
12. Recuperar la fase acuosa y adicionar 1/10 del volumen de acetato de potasio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar y centrifugar a 10 000 rpm y 4 °C durante 10 min.
13. Retirar el sobrenadante y adicionar 1 ml de etanol al 70 %.
14. Resuspender, centrifugar 2 min a temperatura ambiente y descartar el sobrenadante. Repetir una vez más el lavado
15. Retirar todo el sobrenadante y dejar los tubos abiertos hasta que todo el etanol se evapore
16. Resuspender en 100 µl de TE-RNasa (50 µg/ml) y analizar la preparación de DNA en un gel de agarosa al 1 %. El DNA obtenido puede ser utilizado como templado para reacciones de PCR

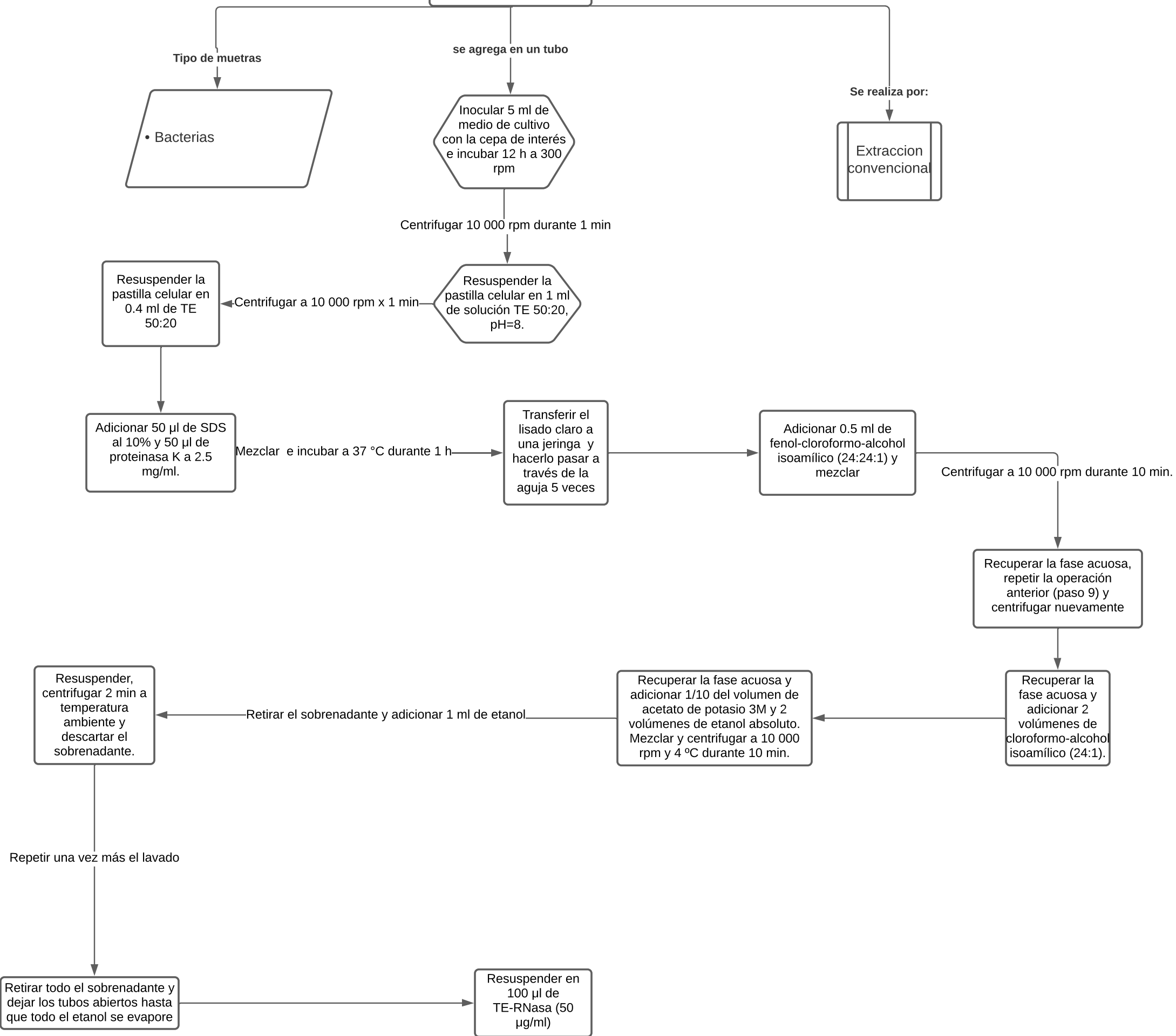
(CONOGASI, 2017)

Notas:

- Realizar los lavados para eliminar totalmente los contaminantes (fenol, lípidos, proteínas y residuos de medio de cultivo.
- Elegir un medio de cultivo nutritivo o de transporte para que tenga menor interferencia por sus componentes durante la extracción de material genético

(CONOGASI, 2017)

Aislamiento de ADN



+ Extracción alcalina en procariontes

Introducción y fundamento.

El método implica recolectar las bacterias de interés de los medios de cultivo y exponerlas a una solución alcalina (que consiste básicamente en SDS y NaOH). El SDS actúa como detergente para lisar las células y desnaturalizar las proteínas, mientras que la condición alcalina desnaturaliza el ADN genómico, el ADN plasmídico y las proteínas. La adición de acetato de potasio (pH 5,2) neutraliza la mezcla y da como resultado la renaturalización del plásmido y del ADN genómico. La adición adicional de etanol (o isopropanol) precipita el ADN genómico, mientras que el ADN plasmídico se puede recolectar del sobrenadante después de una breve centrifugación de 2 minutos. Esta técnica se considera una de las formas más rápidas, fiables y relativamente fáciles de obtener ADN plasmídico de las células. (Prieto *et al.*, 2010) (Ali *et al.*, 2017)

Duración: 1 hora

Materiales.

1. Cultivo con cepa de interés
2. Tubos eppendorf
3. Solución GTE: Glucosa, Tris y EDTA
4. solución de lisis (NaOH, SDS)
5. solución de neutralización (acetato potásico 3M, pH 4,8).
6. Etanol absoluto
7. tampón TE (pH 8,0), r
8. Ribonucleasa A

Métodos.

1. Recoger 1,5 mL (2 x 750 µl) de un cultivo estacionario de una bacteria. Este cultivo creció durante toda la noche a 37°C en medio.
2. Dispensar en un tubo eppendorf y centrifugar a temperatura ambiente, durante 3 min a 12.000 g.
3. Retirar el sobrenadante (2 x 750 µl) y tirar.
4. Con el precipitado de las bacterias, suspender el sedimento de bacterias en 100 µl de una solución isotónica (GTE: Glucosa, Tris y EDTA) a 4°C. Dejar a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Añadir 200 µl de la solución de lisis (NaOH, SDS). Se agita suavemente con la mano por inversión del tubo (unas 10 veces). Se incuba 5 min a 4°C.
7. Añadir 150 µl de solución de neutralización (acetato potásico 3M, pH 4,8). Agitar por inversión del tubo (unas 10 veces). Incubar 5 min a 4°C.
8. Los agregados macromoleculares se precipitan por centrifugación (15 min a 12.000 g y 4°C), formándose un sedimento blanco de aspecto lechoso.
9. Retirar (2 x 200 µl) con cuidado el sobrenadante con el DNA plasmídico y trasvasar en un tubo limpio.
10. Añadir 1 ml de etanol absoluto (4°C) al tubo en el que hemos puesto la solución con el DNA plasmídico. Mezclar por inversión del tubo (unas 10 veces). Se incuba 15 min a 4°C.

11. Precipitar los plásmidos por centrifugación (15 min a 12.000 g y 4°C), tirar (2 x 750 µl) cuidadosamente el sobrenadante (punta azul dentro de punta amarilla) y tirar.
12. Añadir 900 µl de etanol al 70% (4°C). Mezclar por inversión del tubo (unas 10 veces).
13. Precipitar los plásmidos por centrifugación (10 min a 12.000 g y 4°C), Retirar el sobrenadante y tirar.
14. Centrifugar y tirar sobrenadante.
15. Disolver el precipitado de los plásmidos en 50 µl de tampón TE (pH 8,0), con ribonucleasa A.
16. Incubar temperatura ambiente 5 min. Mantener la muestra a 4°C
(Prieto et al., 2010)

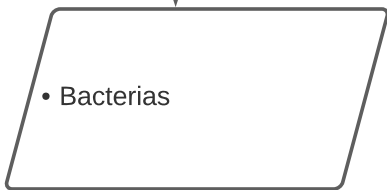
Notas:

La mezcla vigorosa durante las fases de lisis y neutralización puede provocar la fragmentación del ADN genómico, lo que da como resultado la contaminación con el sobrenadante del plásmido. El ADN purificado es adecuado para aplicaciones menos sensibles. Para aplicaciones más sensibles, se necesita un paso de purificación, generalmente con columnas de centrifugado.

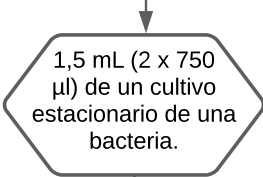
(Prieto et al., 2010)

Aislamiento de ADN

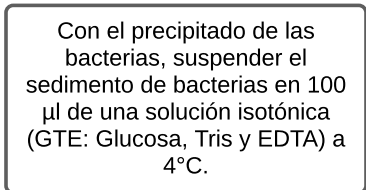
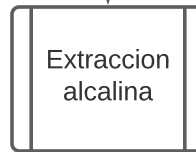
Tipo de muestras



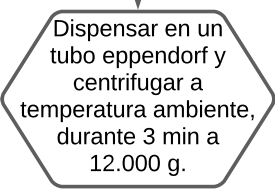
se agrega en un tubo



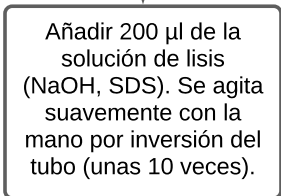
Se realiza por:



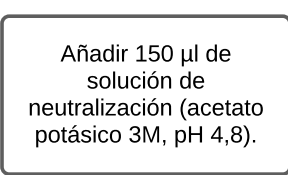
Retirar el sobrenadante y tirar.



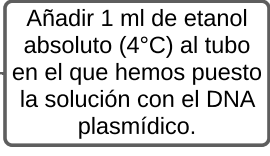
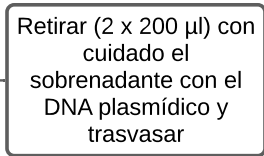
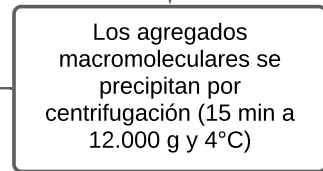
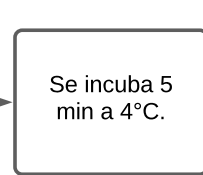
Dejar a temperatura ambiente x 5 min.



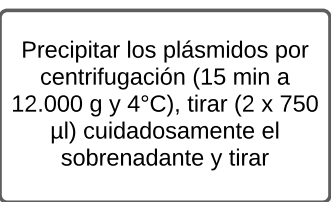
Se incuba 5 min a 4°C.



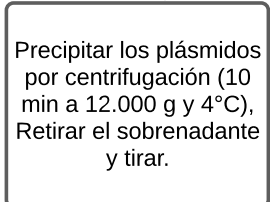
Agitar por unas 10 veces.



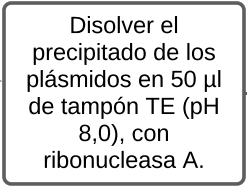
Incubar 15 min a 4°C.



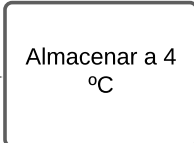
Añadir 900 μ l de etanol al 70% (4°C).



Centrifugar y tirar sobrenadante.



Incubar temp. ambiente 5 min.



Métodos de extracción especiales

+ Extracción con solución TRI-REAGENT para tejido animal, vegetal, bacterias, virus, células cultivadas y sangre.

Introducción y fundamento

Este producto es una mezcla de tiocianato de guanidinio (potente agente caotrópico, desnaturizante) y fenol. En su presencia, las células se lisan rápidamente, se solubilizan sus componentes y se inactivan las ribonucleasas. La adición posterior de cloroformo genera una fase acuosa (con el RNA) y una fase orgánica (con proteínas desnaturizadas); el DNA queda en la interfase. (Prieto et al., 2010)

Tipo de muestra: tejidos, sangre, células, virus, bacterias, en otras.

Duración: 1 hora

Materiales

Solución TRI-REAGETTM

Cloroformo

Isopropanol

Métodos

1. Homogenizar la muestra (aprox. 5 millones de células humanas) en 500 µl de TRI-REAGENT.
2. Añadir 500 µl más de TRI-REAGENT y mezclar. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
3. Añadir 200 µl de cloroformo (frío) y agitar 30 seg. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
3. Separar las dos fases por centrifugación por 15 min a 12.000 g y 4°C.
4. Retirar 3 veces 175 µl la fase superior acuosa (incolora) y dispensar en un tubo eppendorf.
5. Añadir 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA y agitar por 30 seg. Incubar 10 min a temperatura ambiente. Centrifugar por 15 min a 12.000 g y 4°C.
6. Retirar el sobrenadante evitando tocar el precipitado y tirar.
7. Centrifugar y retirar el sobrenadante faltante y desechar.
8. Disolver el precipitado con el RNA en 75 µl de agua. Calentar por 10 min a 55-60°C y enfriar rápidamente. Centrifugar y mantener la muestra a 4°C.

ADN

1. Retirar la fase acuosa restante que recubre la interfase.
2. Precipitar el ADN de la interfase y la fase orgánica con etanol. Añadir 0,3 ml de etanol al 100% por 1 ml de TRI REAGENT utilizado para la homogeneización inicial y mezcle las muestras inversión.
3. Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 2-3 minutos y sedimente el ADN mediante centrifugación a 2000 g durante 5 minutos a 4°C.
4. Eliminar el sobrenadante de fenol-etanol y almacenar a 4°C para el posterior aislamiento de proteínas.
5. Lavar el sedimento de ADN dos veces en una solución que contiene citrato trisódico 0,1 M en etanol al 10% (no se requiere ajuste de pH). Utilice 1 ml de la solución por 1 ml de TRI REAGENT utilizado para la homogeneización inicial.

5. En cada lavado, incubar el sedimento de ADN en la solución de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 2000 g durante 5 minutos a 4 - 25 C.
7. Suspender el sedimento de ADN al 75% etanol (1,5 - 2 ml de etanol al 75% por 1 ml de TRI REAGENT), almacenar durante 10-20 min a temperatura ambiente (Este lavado con etanol elimina el color rosado del sedimento de ADN.)
8. Centrifugar a 2000 g durante 5 minutos a 4 - 25 C.
9. Lavar citrato trisódico 0,1 M-etanol al 10% para gránulos grandes que contienen > 200 µg de ADN o grandes cantidades de un material que no es de ADN.
10. Retirar el lavado con etanol y secar brevemente al aire el sedimento de ADN manteniendo los tubos abiertos durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente.
11. Disolver el sedimento de ADN en NaOH 8 mM pasando lentamente a través de una pipeta.
12. Agregar una cantidad adecuada de NaOH 8 mM para acercarse una concentración de ADN de 0,2 a 0,3 µg / µl. Por lo general, agregue de 0,3 a 0,6 ml de NaOH 8 mM al ADN aislado de 50 a 70 mg de tejido o 107 células.
13. Retirar este material por centrifugación a 12.000 g durante 10 minutos y transferir el sobrenadante resultante que contiene ADN a nuevos tubos.
(Una alta viscosidad del sobrenadante indica la presencia de ADN de alto peso molecular.)
(Prieto et al., 2010)

Notas:

- Para facilitar el aislamiento de ARN de muestras pequeñas (<106 células o <10 mg de tejido) realizan la homogeneización (o lisis) en 0,8 ml de TRI REAGENT complementado con 2 - 8 µl de Polyacryl CarrierTM (membrana de unión).
- Después de la homogeneización (antes de la adición de cloroformo), las muestras pueden almacenarse a -70 C durante al menos un mes.
- El ARN del precipitado se puede almacenar en etanol al 75% a 4 C durante al menos una semana, o al menos un año a -20 C.
- Para células cultivadas en monocapa, use la cantidad de TRI REAGENT basada en el área de una placa de cultivo y no en la célula
- El uso de una cantidad insuficiente de TRI REAGENT puede resultar en la contaminación del ARN aislado con ADN.
- Las manos y el polvo pueden ser una fuente importante de contaminación por ARNasa. Use guantes y mantenga los tubos cerrados durante todo el procedimiento.
- Puede ser necesario un paso de aislamiento adicional para muestras con un alto contenido de proteínas, grasas, polisacáridos o extracelulares.
- En muestras de tejido graso, un exceso de grasa se acumula como una capa superior que debe eliminarse. Transfiera el sobrenadante transparente a un tubo nuevo y proceda con la separación de fases.
- El ADN de alto peso molecular se puede recuperar del sedimento.
- Las muestras líquidas (líquido amniótico, suero, sangre total) deben procesarse con TRI REAGENT LS (TS 120) o TRI REAGENT BD (TB 126).
- El uso de una solución alcalina suave asegura la solubilización completa del sedimento de ADN. En esta etapa, las preparaciones de ADN (especialmente de tejidos) todavía contienen material insoluble (fragmentos de membranas, etc.).
(Prieto et al., 2010)

+ Extracción de ADN para muestras forenses por Chelex

Introducción y fundamento

Es una resina quelante que se utiliza con frecuencia en el campo de la medicina forense para la extracción de ADN de diversas fuentes, como el pelo, las tarjetas para manchas de sangre y los hisopos bucales. Hervirla muestra en presencia de Chelex puede aumentar la señal durante la amplificación por PCR de una cantidad relativamente menor de ADN, posiblemente inhibiendo la degradación del ADN al quelar los iones metálicos que provocan la degradación del ADN a altas temperaturas y condiciones iónicas más bajas. Chelex es un copolímero de estireno divinilbenceno que contiene pares de iones iminodiacetato, que se utilizan como quelantes de iones metálicos polivalentes. Esta técnica es interesante ya que es rápida, tiene pocos pasos de manipulación y no utiliza productos químicos peligrosos como fenol / cloroformo. Su principal inconveniente es la incapacidad de eliminar eficazmente los inhibidores de la PCR de muestras complejas debido a la falta de pasos de purificación. Este método tampoco es adecuado para análisis de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), porque la exposición del ADN a la alta temperatura y alcalinidad de este protocolo da como resultado la desnaturalización y la rotura del ADN. (Barber, 2012)

Materiales

1. Tubos Chelex
2. Pinzas estériles
3. Termoblock

Métodos

1. Retirar los tubos prefabricados llenos de 300 µl de Chelex al 10%. previamente refrigerados.
2. Encender el bloque calefactor. Ajuste a 95 °C. Rellenar los agujeros con agua.
3. Con pinzas estériles, retirar un pequeño trozo de tejido de su muestra, destape el tubo de chelex, coloque la muestra en el tubo.
4. Agitar las muestras en el vórtex en Chelex. durante 10-15 segundos.
8. Girar las muestras por 10-15 segundos a alta velocidad en microcentrífuga.
9. Incubar las muestras durante 20 minutos a 95 ° C.
10. Agitar las muestras durante 10-15 segundos.
11. Centrifugar los tubos a alta velocidad en microcentrífuga para asegúrese de que todo el contenido esté en la parte inferior del tubo de microcentrífuga.
12. Listo para el uso inmediato

(Barber, 2012)

Notas:

- La pieza de tejido debe ser lo suficientemente grande para ser visible, pero no tanto como para ser fácilmente visible. Imagine cortar una sección de 0,2 mm de una grapa estándar. Esto es bastante grande. Demasiado tejido puede inhibir sus reacciones.
- Las muestras funcionan mejor si se utilizan inmediatamente, pero a veces, es mejor esperar durante la noche antes de usarlos. Experimente y encuentre lo que funciona para su tipo de muestra.
- Cuando realice PCR iniciales, realice una dilución en serie de la plantilla. La cantidad de ADN de Chelex.
- Si no obtiene amplificaciones de su PCR la primera vez con un extracto de Chelex, repita el procedimiento de agitar, girar, incubar, agitar, girar y dejar reposar durante la noche descrito anteriormente. (*Barber, 2012*)

Aislamiento de ADN

Tipo de muestras

- Muestras de inters forenser

tubos prefabricados llenos de 300µl de Chelex al 10%. previamente refrigerados.

Se realiza por:

Chelex

Incubar a 95°C

Destapar el tubo de chelex y coloque la muestra en el tubo.

retirar trozo de tejido de la muestra

Rellenar los agujeros con agua.

Agitar

Girar las muestras por 10-15 segundos a alta velocidad en microcentrifuga.

Incubar x 20 minutos a 95 ° C

Centrifugar los tubos a alta velocidad en microcentrifuga

Listo para su uso.

Extracción de ARN

La técnica de extracción de ARN más común y más antigua es la extracción con tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo, que se conoce comúnmente como el método de extracción de ARN "TRizol" [5]. Ahora existen variedades de kits basados por columnas disponibles comercialmente que son menos peligrosos y simplifican el proceso de aislamiento de ARN. La extracción de ARN requiere precauciones estrictas ya que el ARN es lábil debido a la presencia de ARNasas ubicuas y resistentes que pueden degradar las muestras de ARN. Al aislar ARN, son esenciales buenas técnicas de laboratorio y técnicas libres de ARNasa. Las siguientes pautas deben observarse cuidadosamente al trabajar con ARN.

1. Utilice siempre guantes desechables.
2. Las técnicas microbiológicas y de descontaminación buenas y limpias evitarán la contaminación microbiana.
3. Utilice recipientes de plástico desechables estériles y pipetas automáticas reservadas para el trabajo con ARN para evitar la contaminación cruzada con ARNasas de equipos compartidos.

Aquí describimos tres técnicas de aislamiento de ARN: el protocolo TRizol tradicional, un protocolo para el aislamiento de ARN de sangre total, aspirado de médula ósea y tejido fresco / congelado mediante el kit Qiagen QIAamp® Blood Mini, y un protocolo para el aislamiento de ARN de FFPE muestras utilizando el kit de aislamiento de ácido nucleico total Ambion RecoverAll. (*Mullegama et al., 2018*)

+ Extracción de ARN mediante el protocolo de reactivo TRIzol para aspirado de sangre total y médula ósea

Introducción y Fundamento

El reactivo TRIzol es un reactivo diseñado para el aislamiento de ARN total o el aislamiento simultáneo de ARN, ADN y proteínas a partir de una variedad de muestras biológicas. Esta solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina está diseñada para aislar fracciones separadas de ARN, ADN y proteínas a partir de muestras de tejidos y células de origen humano, animal, vegetal, levadura o de origen bacteriano en el plazo de 1 hora.

El principio básico del método es la separación del ARN del ADN y las proteínas después de la extracción con una solución ácida, que consiste principalmente isotiocianato de guanidina en acetato de sodio, fenol y cloroformo, seguida de centrifugación. El ARN total permanece en la fase acuosa superior, mientras que la mayor parte del ADN y las proteínas permanecen en la interfase o en la fase orgánica inferior en condiciones ácidas. A continuación, se recupera el ARN total mediante precipitación con isopropanol y se puede utilizar para un proceso posterior. (Ali et al., 2017)

Duración: 2 horas aproximadamente.

Materiales

1. Aspirado de sangre total o de médula ósea.
2. 5 PRIME™ Phase Lock Gel™ (PLG) tubos pesados de 1,5 ml
3. Tampón EL (tampón de lisis de eritrocitos)
4. Reactivo TRIzol
5. Mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico
6. Isopropanol al 100% (2-propanol).
7. Agua tratada con DEPC.
8. Etanol al 100% .
9. Etanol al 75%.

Métodos

1. Añadir 2 ml de sangre entera bien mezclada o aspirado de médula ósea a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml.
2. Añadir 10 ml de tampón EL.
3. Mezclar suavemente vertiendo de 10 a 15 veces.
4. Incubar durante 10 a 15 min en hielo y agitar brevemente dos veces durante la incubación
5. Centrifugar a 400 g a 5 ± 3 ° C durante 10 min.
6. Retirar el sobrenadante dejando atrás el sedimento de glóbulos blancos (WBC) y un pequeño volumen de sobrenadante.

7. Agregar 3 ml de tampón EL al sedimento celular y resuspender los glóbulos blancos en el sobrenadante.
8. Centrifugar a 400 g a 5 ± 3 ° C durante 10 min.
9. Retirar el sobrenadante dejando atrás el sedimento de WBC y un pequeño volumen de sobrenadante.
10. Verter el tubo sobre un papel absorbente limpio durante al menos 10 seg para que se escurra.
11. Resuspender completamente el sedimento celular en cualquier sobrenadante residual
12. Añadir 600 µl de reactivo TRIzol® al sedimento celular.
13. Agitar la muestra en el vórtex.
14. Incubar a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante 5 min.
15. Durante la incubación, centrifugar un tubo PLG Heavy a 12.000 g durante 45 seg.
16. Agitar en vórtex el lisado celular brevemente.
17. Pipetear el lisado celular en el tubo PLG Heavy pre-hilado.
18. Añadir 150 µl de cloroformo-alcohol isoamílico.
19. Agitar en el vórtex durante 10 seg.
20. Incubar las muestras a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante 2 min.
21. Centrifugar a 12.000 g durante 15 min.
22. Transferir con cuidado la fase acuosa (capa superior, transparente) a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
23. Añadir 150 µl de isopropanol a la fase acuosa.
24. Agitar en el vórtex durante 10 seg.
25. Incubar a temperatura ambiente (15–25 ° C) durante 10 min.
26. Centrifugar la muestra a 12000 g durante 10 min.
27. Retirar y desechar el sobrenadante.
28. Lavar el sedimento con 300 µl de etanol al 75% en agua tratada con DEPC.
29. Centrifugar a 7500 g durante 5 min.
30. Retirar y desechar el sobrenadante de etanol
31. Centrifugar el tubo y eliminar el etanol residual.
32. Secar al aire el sedimento de ARN.
33. Resuspender el sedimento en ≤ 30 µl de agua tratada con DEPC.
34. Almacenar ARN.

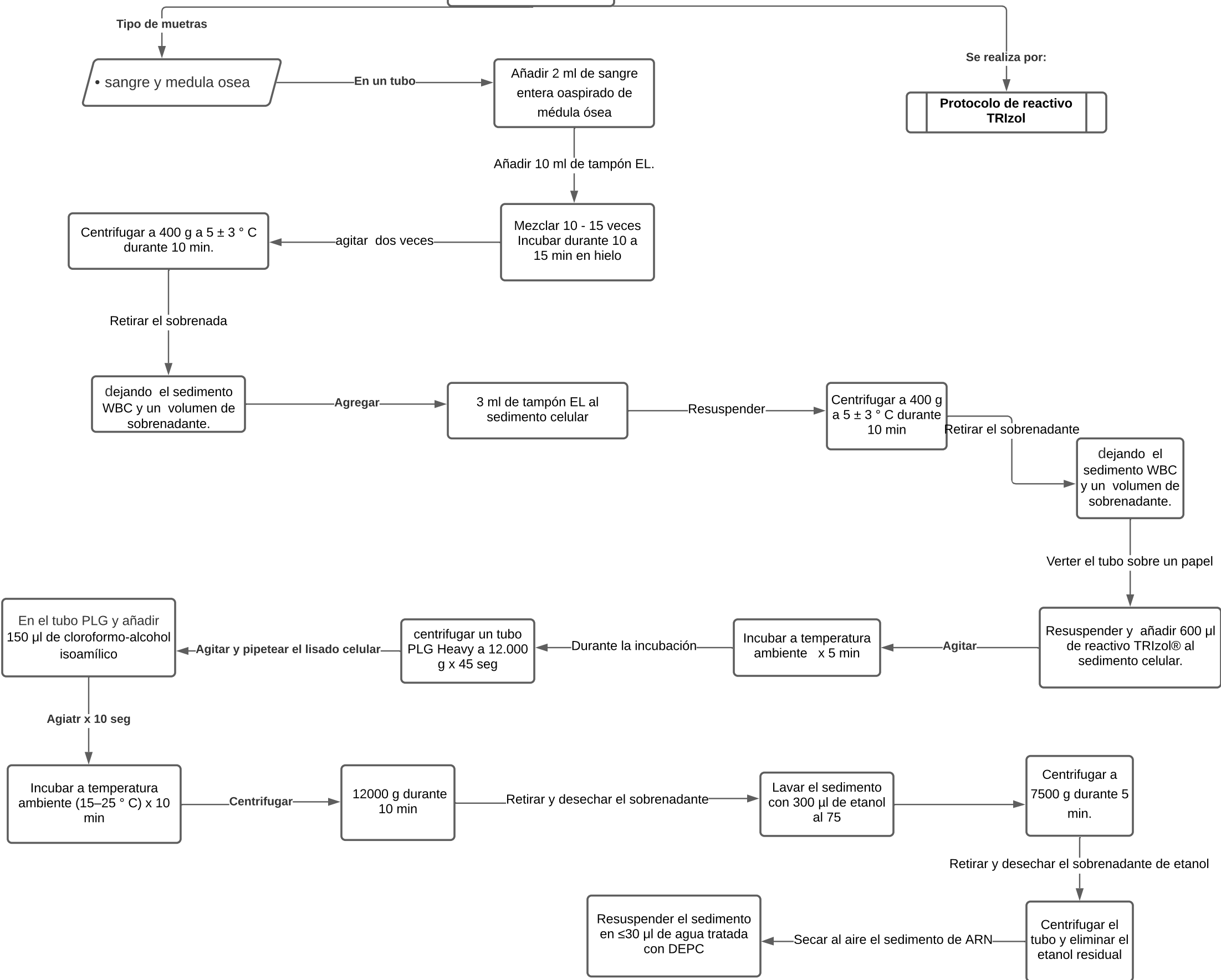
(Mullegama et al., 2018) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014)

Notas:

- Comprobar si hay precipitados en Buffer EL antes de usar. Si hay precipitados, disolver incubando a 56 ± 2 ° C. Mezclar bien antes de usar. Almacenar a 15–25 ° C.
- Utilice una solución RNase AWAY™ o similar en guantes, mesa y pipetas para evitar la contaminación por RNAsa.
- Este método está optimizado para 2 ml de sangre total o aspirado de médula ósea. Si comienza con un volumen diferente de sangre total o aspirado de médula ósea, se deben agregar cinco volúmenes de Buffer EL a un volumen de sangre o aspirado de médula ósea.
- La mezcla debe cambiar de turbia a translúcida, lo que indica la lisis de los glóbulos rojos. La incubación se puede extender a 20 minutos si es necesario.
- Asegurar de que no queden grumos de células.
- Evitar eliminar o romper la barrera de interfase de gel y la fase orgánica (capa inferior) atrapada debajo de ella.
- Tener cuidado de no perturbar el pellet apenas visible.
- Los gránulos deberían volverse más visibles después del lavado con etanol.
- Tener cuidado de no alterar el pellet.
- El ARN se puede almacenar a 2-8 ° C durante 1 semana o de -70 ° C a -80 ° C hasta 6 meses después de la extracción.

(Mullegama et al., 2018) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014)

Aislamiento de ARN



+ Extracción de ARN procedimiento para sangre total, aspirado de médula ósea y tejido fresco / congelado

Introducción y fundamento

Este procedimiento es para el aislamiento del ARN celular total a partir de sangre, aspirado de médula ósea y tejido fresco o congelado a través del mini kit Qiagen QIAamp® RNA Blood.

Los mini kits de sangre de ARN de QIAamp proporcionan un método rápido y sencillo para la preparación de ARN celular total a partir de hasta 1,5 ml de sangre completa humana. Se pueden procesar varias muestras de sangre simultáneamente en menos de 1 hora.

Los contaminantes y los inhibidores de enzimas como la hemoglobina y la heparina se eliminan por completo, dejando el ARN purificado listo para su uso en aplicaciones posteriores. (QIAGEN, 2010)

Además, los mini kits de sangre de ARN QIAamp se pueden utilizar para purificar el ARN total de tejidos y células cultivadas, y para separar el ARN de proteínas, sal y otros componentes de reacción después de reacciones enzimáticas como digestiones con ADNasa, digestiones con proteinasas, ligadura de ARN y reacciones de marcado.

Las columnas de centrifugación representan una tecnología para la preparación de ARN total que combina las propiedades de unión selectiva de una membrana a base de sílice con la velocidad y la conveniencia de la tecnología microspin. Un sistema de amortiguación especializado con alto contenido de sal permite que las especies de ARN de más de 200 bases se unan a la membrana. Durante el procedimiento para la purificación de ARN de la sangre, los eritrocitos se lisan selectivamente y los leucocitos se recuperan por centrifugación. Luego, los leucocitos se lisan utilizando condiciones altamente desnaturizantes que inactivan inmediatamente las ARNasas, lo que permite el aislamiento del ARN intacto.

Después de la homogeneización del lisado mediante una breve centrifugación a través de una columna giratoria, se agrega etanol para ajustar las condiciones de unión y la muestra se aplica a la columna giratoria. El ARN se une a la membrana de sílice durante un breve paso de centrifugación. Los contaminantes se eliminan por lavado y el ARN total se eluye en 30 µl o más de agua libre de ARNasa para uso directo en cualquier aplicación posterior. Dado que el procedimiento se basa en leucocitos intactos, no se puede utilizar sangre congelada. (QIAGEN, 2010)

Duración: 35-45 minutos aproximadamente

Materiales

1. Aspirado de sangre total o de médula ósea.
2. Tejido fresco o congelado.
3. QIAamp® RNA Blood Mini Kit.
 - (A) Tampón EL (tampón de lisis de eritrocitos)
 - (B) Tampón RLT
 - (C) Tampón RW1.
 - (D) Tampón RPE
 - (E) Agua libre de ARNasa.
 - (F) Columnas de centrifugado QIAshredder™.
 - (G) Columnas de centrifugado QIAamp®.
4. β-mercaptoetanol (2-mercaptoetanol)
5. Etanol al 100%
6. Etanol al 70% (preparado en agua tratada con DEPC)

Métodos

De sangre total o aspirado de médula ósea

1. Añadir un aspirado de médula ósea o sangre entera bien mezclada a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml.
2. Agregar cinco volúmenes de Buffer EL.
3. Mezclar suavemente vertiendo de 10 a 15 veces.
4. Incubar durante 10 a 15 min en hielo y agitar dos veces durante la incubación
5. Centrifugar a 400 g a 5 ± 3 ° C durante 10 min.
6. Retirar el sobrenadante dejando atrás el sedimento de glóbulos blancos (WBC) y un pequeño volumen de sobrenadante.
7. Agregar 3 ml de tampón EL al sedimento celular y resuspender los glóbulos blancos en el sobrenadante.
8. Centrifugar a 400 g a 5 ± 3 ° C durante 10 min.
9. Retirar el sobrenadante dejando atrás el sedimento de WBC y un pequeño volumen de sobrenadante.
10. Verter el tubo sobre un papel absorbente limpio durante al menos 10 seg para que se escurra.
11. Añadir 600 µl de tampón RLT “de trabajo” al sedimento celular.
12. Pipetear hacia arriba y hacia abajo para lisar las células
13. Aplicar con cuidado el lisado celular a una columna giratoria QIAshredder™ en un tubo de recolección de 2 ml sin mojar el borde.

14. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a máxima velocidad durante 2 min.
15. Guardar el lisado y desechar la columna de centrifugado QIAshredder™.
16. Añadir 600 µl de etanol al 70% al lisado homogeneizado y pipetee hacia arriba y hacia abajo varias veces.
17. Aplicar con cuidado hasta 700 µl de la mezcla a una columna de centrifugación QIAamp® en un tubo de recogida de 2 ml sin mojar el borde.
18. Cierrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugue a 8000 g durante 15 seg.
19. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
20. Agregar hasta 700 µl de la mezcla restante a la columna de centrifugado.
21. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 8000 g durante 15 seg.
22. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
23. Repetir los pasos 20 - 22 como sea necesario hasta que todo el lisado se ha transferido a la columna de centrifugación QIAamp®.
24. Añadir 700 µl de tampón RW1 a la columna de centrifugado.
25. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 8000 g durante 15 seg.
26. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y desechar el tubo de recolección que contiene el filtrado.
27. Añadir 500 µl de tampón RPE a la columna de centrifugado.
28. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugue a 8000 g durante 15 seg.
29. Transferir la columna de centrifugado a un nuevo tubo de recolección y deseche el tubo de recolección que contiene el filtrado.
30. Añadir 500 µl de tampón tampón RPE a la columna de centrifugado.
31. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a máxima velocidad durante 3 min.
32. Transferir la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y desechar el tubo de recogida que contiene el filtrado.
33. Agregar 30 µl de agua libre de RNasa a la columna de centrifugado.
34. Cerrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a 8000 g durante 1 min.
35. Repetir los pasos 33 y 34.
36. Desechar la columna de centrifugado.
37. Almacenar ARN

De tejido fresco o congelado

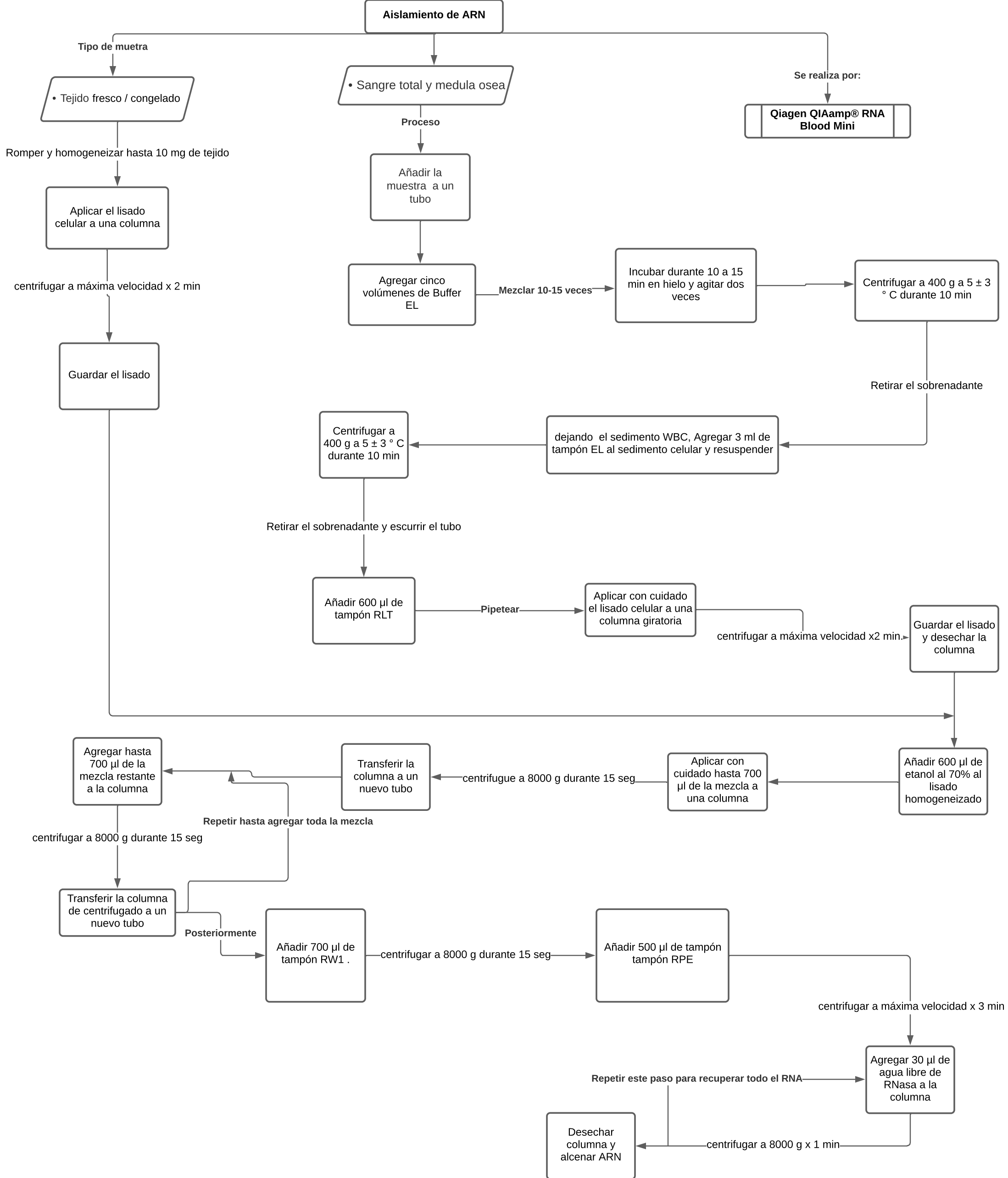
1. Romper y homogeneizar hasta 10 mg de tejido
2. Cuando el tejido esté completamente lisado, aplicar el lisado celular a una columna giratoria QIAshredder™ en un tubo de recolección de 2 ml sin mojar el borde.
3. Cierrar la tapa de la columna de centrifugado y centrifugar a máxima velocidad durante 2 min.
4. Guardar el lisado y desechar la columna de centrifugado QIAshredder™.
5. Seguir los pasos 16 - 37 de la extracción de RNA por Qiagen QIAamp® RNA Mini Procedimiento de sangre para sangre entera o aspirado de médula ósea anteriormente.

(QIAGEN, 2010) (Mullegama et al., 2018)

NOTAS

- Agregar β -mercaptoetanol al Buffer RLT antes de su uso. Añada 10 μ l de β -mercaptoetanol por 1 ml de Buffer RLT. Después de la adición de β -mercaptoetanol, el tampón de trabajo RLT es estable durante 1 mes a temperatura ambiente (15–25 ° C).
- Comprobar si hay precipitados en Buffer RLT antes de usar. Si hay precipitados, disuélvalos incubándolos a 56 ± 2 ° C. Mezclar bien antes de usar. Almacenar a 15–25 ° C.
- Con el primer uso de Buffer RPE, agregue etanol (96–100%) en la cantidad indicada en la botella. Almacenar a 15–25 ° C.
- Los lisados celulares se pueden almacenar durante varios meses entre -60 ° C y -80 ° C. Para procesar lisados congelados, descongelar e incubar en un baño de agua a 37 ± 2 ° C hasta que se descongelen por completo y las sales se disuelvan. Evite la incubación prolongada, que puede comprometer la integridad del ARN.
- Comprobar si hay precipitados en Buffer EL antes de usar. Si hay precipitados, disuélvalos incubándolos a 56 ± 2 ° C. Mezclar bien antes de usar. Almacenar a 15–25 ° C.
- Utilizar una solución RNase AWAY™ o similar en guantes, mesa y pipetas para evitar la contaminación por RNAsa.
- La mezcla debe cambiar de turbia a translúcida, lo que indica la lisis de los glóbulos rojos. La incubación se puede extender a 20 minutos si es necesario.
- Asegurar de que no queden grumos de células.

(QIAGEN, 2010)



+ Aislamiento de ácido nucleico para FFPE (tejido embebido en parafina).

Introducción y Fundamento

El ARN en las muestras procesadas para histopatología está fragmentado y químicamente modificado, lo que lo hace incompatible con muchas técnicas de análisis molecular. No se puede cambiar el grado de fragmentación del ARN que ya se ha producido en las muestras de FFPE antes del aislamiento del ácido nucleico. Sin embargo, las condiciones de digestión de proteasas del kit Ambion RecoverAll están diseñadas para liberar, en un período de tiempo relativamente corto, una cantidad máxima de fragmentos de ARN de todos los tamaños, incluidos los microARN.

El kit de aislamiento de ácido nucleico total RecoverAll™ está diseñado para extraer ácidos nucleicos totales (ARN, miARN y ADN) de tejidos fijados con formaldehído o paraformaldehído e incluidos en parafina (FFPE). Se pueden procesar hasta cuatro secciones de 20 µm, o hasta 35 mg de muestras de núcleo no seccionadas, por reacción.

Las muestras de FFPE se desparafinan utilizando una serie de lavados con xileno y etanol. A continuación, se someten a una rigurosa digestión con proteasas con un tiempo de incubación adaptado para la recuperación de ARN o ADN. Los ácidos nucleicos se purifican utilizando una metodología de filtrado rápido de fibra de vidrio que incluye un tratamiento con nucleasa en el filtro y se eluyen en agua o en el tampón con bajo contenido de sal que se proporciona. Los ácidos nucleicos recuperados son adecuados para aplicaciones posteriores, como análisis de micromatrices, RT-PCR cuantitativa en tiempo real y detección de mutaciones. Sin embargo, la fijación y el almacenamiento de la muestra suelen provocar la fragmentación y modificación del ácido nucleico. El procedimiento RecoverAll no afecta la fragmentación del ácido nucleico y algunas modificaciones químicas pueden permanecer después del procedimiento, por lo que algunos procedimientos posteriores pueden requerir modificaciones para obtener mejores resultados. (*Life Technologies Corporation, 2011*)

Duración: 1 hora y 30 minutos aproximadamente

Materiales

1. Secciones de portaobjetos sin teñir con FFPE de 5–20 µm cortadas de un bloque de tejido de FFPE o ≥35 mg de muestra de tejido de biopsia de núcleo de FFPE sin cortar.
2. Xileno.
3. Etanol al 100%
4. Cartucho de fibra de Vidrio
5. aditivo de aislamiento
6. Lavado 1 y 2/3

Métodos

1. Raspar el equivalente a secciones de 80 µm de tejido FFPE de los portaobjetos con una hoja o bisturí estéril de un solo borde o raspe 35 mg de muestra de biopsia de núcleo FFPE con una hoja o bisturí estéril de un solo borde en un tubo de 1,5 ml.
2. Añadir 1 ml de mezcla de xileno al 100% e incubar durante 3 min a 50 ° C
3. Centrifugar durante 2 min y desechar el xileno
4. Lavar el sedimento dos veces con 1 ml de etanol al 100% y agitar en vórtex cada vez
5. Aspirar o secar el pellet al aire durante 30-45 min o bloque de calor durante 20 min
6. Agregar tampón de digestión.
7. Agregar 4 µl de proteasa.
8. Agitar el tubo suavemente para mezclar
9. Incubar a 50 ° C durante 15 min, luego a 80 ° C durante 15 min.
10. Preparar la mezcla de aditivo de aislamiento / etanol
11. Agregar aditivo de aislamiento / etanol a cada muestra y mezcle.
12. Pasar 700 µl de mezcla a través de un cartucho filtrante
13. Centrifugar a 10.000 g durante 30 seg
14. Desechar el flujo continuo.
15. Lavar con 700 µl de lavado 1.
16. Centrifugar durante 30 seg a 10.000 g para hacer pasar la mezcla a través del filtro.
17. Desechar el flujo continuo.
18. Lavar con 500 µl de lavado 2/3.
19. Centrifugar durante 30 seg a 10.000 g para eliminar el líquido residual.
20. Desechar el flujo continuo.
21. Repetir los pasos 18 - 20.
22. Centrifugar durante 30 segundos más a 10.000 g para eliminar el líquido residual del filtro.
23. Agregar la mezcla de ADNasa o ARNasa a cada cartucho de filtro e incubar durante 30 min.
24. Lavar con 700 µl de lavado 1.

25. Lavar dos veces con 500 µl de lavado 2/3 y luego centrifugar para eliminar el líquido residual.

26. Eluir con 60 µl de solución de elución o agua sin nucleasas a temperatura ambiente.

(Life Technologies Corporation, 2011) (Mullegama et al., 2018)

Notas:

- Si la muestra no forma un sedimento apretado, vuelva a centrifugar durante 2 minutos más. Si aún no se forma un gránulo apretado, proceda con precaución en el siguiente paso.
- El tejido debe volverse opaco.
- Si el tejido de entrada es equivalente a ≤ 40 µm, agregue 100 µl de tampón de digestión. Para tejido de entrada equivalente a 40-80 µm, agregue 200 µl de tampón de digestión.
- Si el tejido se adhiere a los lados del tubo, utilice una punta de pipeta para introducirlo en la solución o centrifugue brevemente para llevar el tejido a la solución.

- Extender la incubación a 80 ° C más de 2 min puede resultar en la degradación del ARN.
- Punto de parada: las muestras se pueden almacenar a -20 ° C y luego descongelar en hielo antes de continuar con el siguiente paso.
- Si usó 100 µl de tampón de digestión, agregue aditivo de aislamiento (120 µl) y etanol al 100% (275 µl). Si usó 200 µl de tampón de digestión, agregue aditivo de aislamiento (240 µl) y etanol al 100% (550 µl).
- Para evitar la obstrucción del filtro, evite pipetear grandes trozos de tejido no digerido en el cartucho del filtro.
- No centrifugar los cartuchos de filtro a fuerzas centrífugas relativas superiores a 10.000 × g, ya que fuerzas superiores pueden dañar los filtros.

(Life Technologies Corporation, 2011) (Mullegama et al., 2018)

Aislamiento de ARN

Tipo de muestras

• tejido **FFPE**

Raspar 35 mg en tubo

Añadir 1 ml de mezcla de xileno e incubar x 3 min a 50 ° C

Centrifugar x 2 min y desechar el xileno

Lavar el sedimento dos veces con 1 ml de etanol

secar el pellet al aire x 30-45 min

Agregar tampón de digestión y 4 µl de proteasa.

Agitar

Incubar a 50 ° C durante 15 min

luego a 80 ° C durante 15 min

Preparar la mezcla de aditivo de aislamiento / etanol

Agregar la mezcla a cada muestra

Pasar 700 µl de mezcla a través de un cartucho filtrante

Centrifugar durante 30 seg a 10.000 g

desechar sobrenadante

Repetir

Lavar con 500 µl de lavado 2/3

Desechar

Centrifugar durante 30 seg a 10.000 g

Agregar la mezcla de ARNasa a cada cartucho de filtro

incubar durante 30 min

Lavar con 700 µl de lavado 1

Lavar dos veces con 500 µl de lavado 2/3 y luego centrifugar

Eluir con 60 µl de solución de elución

Se realiza por:

Ambion RecoverAll Total

ANÁLISIS DE CONTRASTE (Limitaciones y Cualidades)

Las técnicas moleculares para la extracción de material genético constan de cuatro pasos fundamentales, que son necesarios para obtener una gran eficiencia en la extracción de ácidos nucleicos dando como resultado un analito puro y con un buen rendimiento.

El primer paso en estos métodos es la lisis de membrana celular, se lleva a cabo con detergentes como SDS (Dodecilsulfato sódico), enzimas de tipo de proteasa como la Proteinasa K y soluciones orgánicas como solución de guanidinio o xileno, estos compuestos actúan para degradar la membrana celular para permitir la liberación de los ácidos nucleicos. Por ende, el segundo paso es la desnaturalización que se lleva a cabo con agentes quelantes (chelex), agentes caotrópicos, reacciones ácido-base, calor o soluciones orgánicas, permiten disolver el ácido nucleico permitiendo que precipite para su purificación más adelante. Por consiguiente, durante el segundo paso se debe de tratar esta muestra con agentes de inhibición para enzimas de carácter nucleasas. Se inhibirán las enzimas dependiendo del ácido nucleico a extraer.

El último paso es la purificación, este paso es el más crítico porque es el que permite ocupar el ácido nucleico en otra técnica molecular. Se lleva a cabo con soluciones de etanol, isopropanol, nucleasas o por métodos físicos como la filtración, centrifugación, perlas magnéticas y cromatografía de intercambio iónico (membranas de sílice), permite la retención del material genético dando una pureza y una cantidad gratificante de ácido nucleico.

Por consiguiente, existe dos tipos de técnicas, la convencional que se basa por extracción con soluciones orgánicas y la comercial se basa por lavados etanol y métodos físicos. En la tabla 5 se describe las características de estos dos métodos.

Tabla 5. Características de los dos tipos de métodos de extracción de NA

Tipo de metodo	COVENCIONAL	COMERCIAL
Características	Preparacion de solventes Extraccion por medios de solventes, el material genético se encuentra en el medio acuoso, Duracion de proceso muy prolongados, Modificable, Interferencia en otros analisis	Unión del NA a una matriz inorganica (carrier) Se elimina contaminantes con lavados con etanol se obtiene el NA con membranas de sílice, perlas magnéticas, filtros, entre otros. Dependen de la muestra, costosos, poco equipo (algunos), Dependen de la muestra

En la tabla 6 se presenta una descripción de cada método tratado en este proyecto, que describe el tipo de muestra, tiempo duración del proceso, fundamento; de igual forma existen otros dos aportados que nos permite comparar sus cualidades y limitaciones de estas técnicas

DISCUSIÓN

Las técnicas y herramientas moleculares como los kits comerciales son más prácticos y eficientes en comparación con los métodos convencionales, debido a que se basan en la extracción de ácidos nucleicos por métodos físicos como la centrifugación, filtración y detergentes caotrópicos y lavados de etanol, obteniendo material genético de alta pureza y sin residuos de solvente como en los métodos convencionales.

La característica más sobresaliente en los métodos comerciales es el tiempo y el número de muestra a analizar, los métodos comerciales permiten realizar extracción de ácidos nucleicos en 30-60min, casi en todos los métodos tratando máximo 24 muestras.

Las muestras más comunes en los métodos comerciales son sangre, aspirado de médula ósea, tejido fresco o congelado, saliva, muestras bucales o nasofaríngeas, entre otras. Son más factibles utilizarlas en estos métodos porque no necesitan un pretratamiento (sangre, muestra bucales y saliva) o solo una homogeneización en el caso de tejidos. Por el contrario, en los métodos convencionales, requieren de un tratamiento de muestra; si esta muestra es rica en lípidos, proteínas y carbohidratos es el caso del tejido vegetal. En este caso se utiliza el protocolo CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) para la extracción de ADN de tejido vegetal, se ocupa esta técnica porque las técnicas para células eucariotas no son factibles para lisar y solubilizar la celulosa, por consecuencia se opta por CTAB que alcaliniza el tejido vegetal provocando la precipitación de ADN, posteriormente se extrae y purifica de forma convencional con solvente orgánicos. Este es un método que se puede modificar y adaptar fácilmente para el tipo de planta que la que se desea extraer el ácido nucleico, el inconveniente con este protocolo es el tiempo de proceso es muy largo.

En el caso de tejido animal rico en proteínas y lípidos se emplea proteinasa K que es una proteasa que rompe los enlaces peptídicos y facilita la liberación del material genético, tanto convencional y comercial ocupan. Proteinasa K facilita la lisis celular y disminuye el tiempo de separación de lípidos y proteínas de la muestra. Existen protocolos para tejido vegetal que ocupa proteinasa K para sustituir el reactivo CTAB porque si no se realiza una buena

Tabla 6. Metodos de extraccion de AN descriptiva, cualidades y limitaciones

Metodo	Tipo de Metodo	Tipo de muestra	Fudamento	AN Extraido	Cualidades	Limitaciones	Tiempo
Gentra Puregene	Comercial	sangre y medula osea	Lisis de detergentes caotropicos, Inhibidores de DNAsas, Recuperacion por precipitacion	ADN	Uso clinico Rapido Varias muestras Robusto	Sensible no modificable	25 min y 12Hrs
QIA Ampara DNA mini	Comercial	Celuals cultivadas, Tejido fresco/congelado, celulas bucales	lisis por protinasa K, Columnas con membrana de selice, purificacion por lavados, centrifugacion	ADN	6 µg ADN Proteina K facilita lisis Ajustable	Poca manipulacion, para evitar contaminacion, sensible poca muestra (sobrecargar la columna da menor rendimiento)	20-30min
Orange DX-Prepitt L2P	comercila / covencional	saliva	Pretratamiento de muestra, Agentes caotropicos, Inhibidores de DNAsas, Precipitacion	ADN	el transporte funciona como pretratamiento , estabilidad de la muestra, una sola solucion	Larga duracion del proceso, posibilidad de trazas de etanol, tratamiento termico	3 horas
QIAmp DSP	Comercial	Tejido FFTE	Proteinasa K, Centrifugacion, membrana de selice, columnas, lavados para purificar	ADN	no hay trazas de disolventes, extracion por columna	Bajo rendimiento por la muestra, trazas de formaldehido	2Hrs. y 30 min.

Perlas Magneticas	Comercial	Sangre, Tejido, saliva, moco, cultivo de celulas	campos maneticos de perlas y NA de la muestra, Inhibidores, lavados	ADN/RNA	Rendimiento de 90%, rapido, poco pasos, poco equipo	tiempo prolongado menor rendimiento, pretramiento	35 min.
CTAB	Covencional	Tejido vegetal	Disuelve polisaridos de la materia vegetal, Precipita NA	ADN	modificable, adaptable, materia vegetal, estandarizado, ADN puro	Tiempo largo de proceso, Trazas, Toxico	3 horas
Ext. Procariontes	Covencional	Procariontes (bacterias)	SDS detergentes para lisis, proteinasa K, Extraccion por diferencia de densidad, precipitacion NA	ADN	Extrae tanto ADN plamatico y genómico.	medio de cultivo puede intreferir, Trazas de solvente, Proceso largo	1 hr y 35 min.
Ext. Alcalina	Covencional	Procariontes	Desnaturalizacion de ADN por SDS y NaOH, Neutralizacio, etanol para precipitar ADN	ADN	Poco Tiempo, Extrae tanto ADN plamatico y genómico, reaccion Acido-Base	Preparar soluciones fragmentacion, extra-purificacion	1 hora
Chelex	Comercial	Muestras Forense (cabello, sangre en objetos, saliva, piel, etc)	Resina quelante de de estireno venilbenceno con iones polivalentes reteniendo ADN	ADN	Rapido, no ocupa solventes, identificacion rapido, inhibe degradacion de ADN	falta purificacion, no se puede ocupar para otras pruebas, ruptura de ADN.	25 min.

Qiagen ARN Blood	Comercial	Tejido, sangre y medula osea	detergentes caotropicos, retencion por columnas de membrana de selice, centrifugacion	ARN	tratar varias muestras, rapido, adaptativo, almacenar lisados, se puede ocupar muestra lisadas	Pretratamiento nucleasas, precipitacion de soluciones	35-45 minutos
Tri-Reagent	Covencional	Tejido animal/vegetal, bacterias, levaduras, virus, celulas cultivadas	lisis por solucion de guanidinio y fenol, extraccon por cloroformo generando una fase acuosa (ARN)y organica, en la interfase se encuentra ADN	ARN / ADN	Extrae ARN/ADN, varias muestras, adaptable	Toxico, puede interferir en otros procesos	1 hora
Trizol	Covencional	Sangre	Lisis por solucion de fenol e isotiocionato de guanidina, extraccon por cloroformo-alcohol isoamilico generando una fase acuosa (ARN)y organica, en la interfase se encuentra ADN	ARN / ADN	Extrae ARN/ADN, varias muestras, adaptable	Toxico, puede interferir en otros procesos	2 horas
Ambion Recove All	Comercial	Tejido FFPE	Solucion de xileno y fenol para extracion de tejido FFPE, la solucion pasa por un filtro de fibra de vidrio para retener NA, Precipitar con solucion buffer, Lavados y tratamiento de proteasas para eliminar proteinas	ARN/ARN	Extraer ADN de FFPE, 20µg a 60mg de ARN, extrae ADN/ARN	Muestra modificada	45 mins - 1.3hrs

purificación, las trazas de este pueden interferir en métodos posteriores. Otro método comercial es el método de Gentra Puregene extrae el material genético con detergentes caotrópicos para la lisis celular en los leucocitos para precipitar el ADN y se purifica con lavados de etanol que facilita su elución con agua libre de nucleasas. Pero no se compara con las soluciones de Trizol y Tri-Reagent; estas soluciones tienen guanidina y fenol en su formulación que permite la extracción tanto de ARN y ADN, posteriormente se hace una extracción orgánica y lavados de etanol o isopropanol para purificar los ácidos nucleicos.

Esa es su gran cualidad con estas soluciones que puedes extraer tanto ADN y ARN a comparación de Gentra Puregene que solo ADN. Pero existen limitación para estas soluciones esa es su tiempo de proceso es muy largo por consecuencias por los compuestos que ocupa se necesita una purificación extensa y el uso de estos compuestos son tóxicos. Por ende, Gentra Puregene es mejor en cuestión de tiempo porque son solo 25 min y no se ocupan soluciones tóxicas.

Por otra parte, las técnicas de QIA Ampara DNA mini, QIAmp DSP, QIAGEN ARN Blood son métodos que utilizan membranas de sílice, que permite la retención del ADN o ARN para posteriormente eluir con buffer o agua libre de nucleasas. A consecuencia, reduce el tiempo de extracción a 30-45 minutos porque no utilizan soluciones orgánicas. En el kit QIAmp DSP se debe preparar la muestra FFTE por la fijación con solventes del tejido en el portaobjetos, por ende, la técnica tarda dos horas para purificar y extraer el ADN, cómo este tipo de muestra está fijado se extrae poca muestra y puede presentarse dañado el ADN.

La extracción para bacterias se ocupan dos métodos; extracción por Detergente SDS y Extracción Alcalina. Estas técnicas son las más utilizadas para la investigación de ADN plasmático y cromosómico, lo que diferencia estas dos técnicas es el uso de una solución de NaOH en la extracción alcalina. La extracción alcalina reduce el tiempo de la extracción de ADN porque permite una precipitación más rápida por el uso de NaOH provoca una reacción ácido-base. El inconveniente es la fragmentación de ADN por la agresividad de la reacción. Por ende, existe otra técnica por perlas magnéticas, aprovecha las cargas de. Los ácidos nucleicos se retienen con la ayuda de un imán. Es una de las técnicas más eficientes en comparación con las columnas y los procesos convencionales. Debido a que se necesita poco equipo para llevarlo a cabo y se obtiene un excelente rendimiento de alta pureza. Se pueden procesar 32 muestras en 45 min en comparación con columnas que requieren 24 muestras.

Existe una técnica rápida para el análisis de muestra forenses, Chelex es una resina quelante tiene la función de extraer el ADN por fuerzas iónicas de cualquier muestra hasta la más mínima traza, es el único inconveniente es que solo se puede ocupar para identificación

porque no tienen un proceso de purificación, por ende, no permite que el material genético extraído se ocupe en otra técnica molecular.

Es importante enfatizar, la extracción de material genético es el paso preliminar para la mayoría de las técnicas moleculares como PCR y la secuenciación de ácidos nucleicos. Por ende, el manejo de estos métodos se debe realizar de manera mas eficiente para evitar interferencias durante proceso de las demás técnicas moleculares.

CONCLUSIÓN

Actualmente se han diseñado diferentes técnicas y herramientas moleculares adaptables que permiten la obtención y aislamiento de material genético, estos métodos moleculares son reproducibles, precisos, robustos y cuantitativos, lo que facilita su aplicación en una gran diversidad de muestras biológicas y por lo tanto con una gran densidad de aplicaciones.

Esto nos permite desarrollar nuevos métodos y proponer protocolos que nos permitirán obtener el material genético de interés. Este proyecto funcionara como material para desarrollar proponer y actualizar este mismo conforme las necesidades requeridas del alumno o profesionalista especializado en biología molecular.

REFERENCIAS

- ❖ Alejos, L. (2010). Extracción y purificación de ADN. En M. Aragón & A. Cornejo (Eds.), *Extracción y purificación de ADN* (Revisado ed., pp. 1–14).
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
- ❖ Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 2017, 1–13.
<https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- ❖ Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020, noviembre). *PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN* (N.o 2). Universidad de Salamanca.

- ❖ Barber, P. A. U. L. (2012). *Extraction protocol: Chelex*. UCLA Ecology and Evolutionary Biology.
<https://faculty.eeb.ucla.edu/Barber/Web%20Protocols/Protocol2.pdf>
- ❖ BIOTED. (2015). *EXTRACCIÓN ADN BACTERIANO*.
<https://www.bioted.es/protocolos/EXTRACCION-ADN-BACTERIANO.pdf>
- ❖ CONOGASI. (2017, 26 octubre). *Método: Extracción de ADN genómico (procariontes)*. <http://conogasi.org/articulos/metodo-extraccion-de-adn-genomico-procariontes/>
- ❖ Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2009). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 1977–1990.
<https://doi.org/10.1007/s00216-009-3150-9>
- ❖ DNA GENOTEK. (2012). *prepIT®•L2P*. https://www.kyodo-inc.co.jp/documents/bio/oragene/faq_dna04_006.pdf
- ❖ Falcon, L. (2007). 16. Extracción de ácidos nucleicos. En A. Valera (Ed.), *Las herramientas moleculares* (pp. 499–516). Instituto Nacional de Ecología - UNAM.
- ❖ Life Technologies Corporation. (2011). *RecoverAll M Total Nucleic Acid Isolation Kit*. Life Technologies Corporation.
- ❖ Mellado, O. D. M. (2020, 15 septiembre). *TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS*. NPunto.
<https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-el-diagnostico-de-enfermedades-infecciosas>

- ❖ Mullegama, S. V., Alberti, M. O., Au, C., Li, Y., Toy, T., Tomasian, V., & Xian, R. R. (2018). Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Methods in Molecular Biology*, 359–383. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_30
- ❖ Orfao, A., & Morent, M. (2011, mayo). *PNT EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS*. Instituto de Salud Carlos III.
- ❖ Prieto, M. J., Lopez, J., & Pueyo, C. (2010). Purificación de ácidos nucleicos. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, 1(1).
<https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biologia-molecular/pdfs/37%20PURIFICACION%20ACS%20NUCLEICOS.pdf>
- ❖ QIAGEN. (2010). *QIAamp® RNA blood mini handbook* (2.a ed.). QIAGEN.
- ❖ QIAGEN. (2014). *Gentra® Puregene® Handbook* (4.a ed.). QIAGEN.
- ❖ QIAGEN. (2016). *Gentra® Puregene® handbook* (5.a ed.). QIAGEN.
- ❖ QIAGEN. (2017). *Manual del kit QIAamp® DSP DNA FFPE tissue* (1.a ed.). - QIAGEN.
- ❖ QIAGEN. (2018). *QIAamp® DNA Mini Kit*. QIAGEN.
- ❖ Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2013). “DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and the Present”. *BioMed Research International*, 2013, 1.
<https://doi.org/10.1155/2013/628968>
- ❖ Thermo Fisher Scientific Inc. (2014, mayo). *TRI REAGENT® - RNA / DNA / PROTEIN ISOLATION REAGENT* (TR 118).
- ❖ Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*, 24(2), 237–246.
[https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)72468-6)

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Técnicas y herramientas moleculares empleadas para la obtención de material genético

PROYECTO GENÉRICO: Evaluación de productos relacionados con la salud

ALUMNO: Francisco Javier Torres Rosales

MATRÍCULA: 2162033296

DIRECCIÓN: 2da Cerrada del Rosal S/N, San Bartolo, Teoloyucan, C.P.: 54784, Edo. México.

Teléfono:5519805075

CORREO ELECTRÓNICO: umeroforever@gmail.com

Asesor interno

Dra. Ana Laura Esquivel Campos

No. Económico: 33148

Fecha de inicio: 01-Marzo-2021

Fecha de terminación: 03-Septiembre-2021

Fecha de entrega: Septiembre-2021

Resumen

Introducción

La biología molecular tiene como objetivo el estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular. Pretendiendo explicar los fenómenos de la vida a partir de sus propiedades macromoleculares, como principales objetos de estudio son los ácidos nucleicos. Para permitir su estudio, nace la necesidad de crear técnicas moleculares que detectan y cuantifican secuencias genéticas específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) (*Peña Castro, Gregorio Ramírez, Barrera Figueroa, 2013*). Estas técnicas moleculares tienen como finalidad analizar y manipular los ácidos nucleicos, permitiendo detectar e identificar tanto microorganismos, como enfermedades genéticas y creación de productos genéticamente mejorados. Existe un aumento progresivo de técnicas moleculares en el área de cáncer y enfermedades genéticas, convirtiendo el diagnóstico molecular en una de las áreas en crecimiento, revolucionando las estrategias para el tratamiento de diversas patologías y condiciones de salud. Por consiguiente, se elaboran herramientas para la obtención de material genético con diferentes procesos químicos y físicos (*Mellado, 2020*).

La extracción del material genético es el paso más crucial en todo el proceso relacionado con la biología molecular. Se suelen utilizar kits comercializados que incluyen el protocolo específico para la extracción. Los métodos de extracción se caracterizan por la lisis de la célula, la inactivación de las enzimas nucleasas celulares y la separación de los ácidos nucleicos de los demás restos celulares. Pueden ser de diferentes tipos: rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica), por tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles) o por digestión enzimática (proteínasa K) (*Mellado, 2020*).

La obtención de material genético se puede realizar de diferentes tipos de muestra, como sangre, tejido o mucosa, por ende, las herramientas moleculares de extracción van a depender del tipo y composición de la muestra, igualmente, se toma en cuenta cuál es el analito de interés para extraer (ADN o ARN), con el fin de ser utilizada en otra técnica molecular.

La extracción de ácido nucleico es uno de los pasos más fundamentales en biología molecular, y se utiliza de forma rutinaria en muchas áreas de las ciencias biológicas y médicas, ya que este procedimiento marca un punto de partida en cualquier kit de diagnóstico molecular. Este procedimiento crucial se conoce desde hace más de un siglo y se ha desarrollado sustancialmente en las últimas décadas.

La extracción es el método por el cual se obtiene el ADN o ARN a partir de material biológico, utilizando técnicas físicas y químicas. Para obtener el material genético hay diferentes procesos que se pueden basar en diferentes fenómenos como químicos y físicos, ejemplos

de estos son; la precipitación, ultrafiltración, cromatografía, centrifugación y separación por afinidad. El uso del tipo de proceso u otro dependerá de la muestra a ocupar, la cantidad de ésta, el tipo de ácido nucleico y la técnica posterior con la que se va a trabajar (Alejos, 2010).

OBJETIVO GENERAL

Identificar las ventajas y desventajas de las técnicas y herramientas moleculares empleadas para la obtención de material genético

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las principales técnicas moleculares para la obtención de material genético
- Evaluar y comparar las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas moleculares
- Buscar y diseñar herramientas didácticas y simulaciones de laboratorio que puedan ser aplicadas como TIC

ANTECEDENTES DE INVESTIGACIÓN/ RESULTADOS

Las técnicas moleculares para la extracción de material genético constan de cuatro pasos fundamentales, que son necesarios para obtener una gran eficiencia en la extracción de ácidos nucleicos dando como resultado un analito puro y con un buen rendimiento. El primer paso en estos métodos es la lisis de membrana celular, se lleva a cabo con detergentes como SDS (Dodecilsulfato sódico), enzimas de tipo de proteasa como la Proteinasa K y soluciones orgánicas como solución de guanidinio o xileno, estos compuestos actúan para degradar la membrana celular para permitir la liberación de los ácidos nucleicos. Por ende, el segundo paso es la desnaturalización que se lleva a cabo con agentes quelantes (chelex), agentes caotrópicos, reacciones ácido-base, calor o soluciones orgánicas, permiten disolver el ácido nucleico permitiendo que precipite para su purificación más adelante. Por consiguiente, durante el segundo paso se debe tratar esta muestra con agentes de inhibición para enzimas de carácter nucleasas. Se inhibirán las enzimas dependiendo del ácido nucleico a extraer. El último paso es la purificación, este paso es el más crítico porque es el que permite ocupar el ácido nucleico en otra técnica molecular. Se lleva a cabo con soluciones de etanol, isopropanol, nucleasas o por métodos físicos como la filtración, centrifugación, perlas magnéticas y cromatografía de intercambio iónico (membranas de sílice), permite la retención del material genético dando una pureza y una cantidad gratificante de ácido nucleico.

Por consiguiente, existen dos tipos de técnicas, la convencional que se basa por extracción con soluciones orgánicas y la comercial se basa por lavados de etanol y métodos físicos. En la tabla 5 se describen las características de estos dos métodos.

Tabla 5. Características de los dos tipos de métodos de extracción de NA

Tipo de metodo	COVENCIONAL	COMERCIAL
Características	Preparacion de solventes Extraccion por medios de solventes, el material genetioc se encuentra en el medio acuoso, Duracion de proceso muy prolongados, Modificable, Interferencia en otos analisis	Ubion del NA a una matriz inorganica (carrier) Se elimina contaminantes con lavados con etanol se obtiene el NA con menbranss de silice, perlas magneticas, filtros, entre otros. Dependen de la muestra, costosos, poco equipo (algunos), Depeden de la muestra

En la tabla 6 se presenta una descripción de cada método tratado en este proyecto, que describe el tipo de muestra, tiempo duración del proceso, fundamento; de igual forma existen otros dos apartados que nos permite comparar sus cualidades y limitaciones de estas técnicas. (QIAGEN,2010-2018; Orfao, & Morent,2011; Mullegama, Alberti,Toy, Tomasian & Xian, 2018; Tan & Yiap, 2013.)

Discusión

Las técnicas y herramientas moleculares como los kits comerciales son más prácticos y eficientes en comparación con los métodos convencionales, debido a que se basan en la de ácidos nucleicos por métodos físicos como la centrifugación, filtración y detergent extracción es caotrópicos y lavados de etanol, obteniendo material genético de alta pureza y sin residuos de solvente como en los métodos convencionales.

La característica más sobresaliente en los métodos comerciales es el tiempo y el número de muestra a analizar, los métodos comerciales permiten realizar extracción de ácidos nucleicos en 30-60 min, casi en todos los métodos tratando máximo 24 muestras.

Las muestras más comunes en los métodos comerciales son sangre, aspirado de médula ósea, tejido fresco o congelado, saliva, muestras bucales o nasofaríngeas, entre otras. Son más factibles utilizarlas en estos métodos porque no necesitan un pretratamiento (sangre, muestra bucales y saliva) o solo una homogeneización en el caso de tejidos. Por el contrario, en los métodos convencionales, requieren de un tratamiento de muestra; si esta muestra es rica en lípidos, proteínas y carbohidratos es el caso del tejido vegetal. En este caso se utiliza el protocolo CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) para la extracción de ADN de tejido vegetal, se ocupa esta técnica porque las técnicas para células eucariotas no son factibles para lisar y solubilizar la celulosa, por consecuencia se opta por CTAB que alcaliniza el tejido vegetal provocando la precipitación de ADN, posteriormente se extrae y purifica de forma

convencional con solvente orgánicos. Este es un método que se puede modificar y adaptar fácilmente para el tipo de planta que la que se desea extraer el ácido nucleico, el inconveniente con este protocolo es el tiempo de proceso es muy largo.

En el caso de tejido animal rico en proteínas y lípidos se emplea proteinasa K que es una proteasa que rompe los enlaces peptídicos y facilita la liberación del material genético, tanto convencional y comercial ocupan. Proteinasa K facilita la lisis celular y disminuye el tiempo de separación de lípidos y proteínas de la muestra. Existen protocolos para tejido vegetal que ocupa proteinasa K para sustituir el reactivo CTAB porque si no se realiza una buena purificación, las trazas de este pueden interferir en métodos posteriores. Otro método comercial es el método de Genra Puregene extrae el material genético con detergentes caotrópicos para la lisis celular en los leucocitos para precipitar el ADN y se purifica con lavados de etanol que facilita su elución con agua libre de nucleasas. Pero no se compara con las soluciones de Trizol y Tri-Reagent; estas soluciones tienen guanidina y fenol en su formulación que permite la extracción tanto de ARN y ADN, posteriormente se hace una extracción orgánica y lavados de etanol o isopropanol para purificar los ácidos nucleicos.

Esa es su gran cualidad con estas soluciones que puedes extraer tanto ADN y ARN a comparación de Genra Puregene que solo ADN. Pero existen limitación para estas soluciones esa es su tiempo de proceso es muy largo por consecuencias por los compuestos que ocupa se necesita una purificación extensa y el uso de estos compuestos son tóxicos. Por ende, Genra Puregene es mejor en cuestión de tiempo porque son solo 25 min y no se ocupan soluciones tóxicas.

Por otra parte, las técnicas de QIA Ampara DNA mini, QIAmp DSP, QIAGEN ARN Blood son métodos que utilizan membranas de sílice, que permite la retención del ADN o ARN para posteriormente eluir con buffer o agua libre de nucleasas. A consecuencia, reduce el tiempo de extracción a 30-45 minutos porque no utilizan soluciones orgánicas. En el kit QIAmp DSP se debe preparar la muestra FFTE por la fijación con solventes del tejido en el portaobjetos, por ende, la técnica tarda dos horas para purificar y extraer el ADN, cómo este tipo de muestra está fijado se extrae poca muestra y puede presentarse dañado el ADN.

La extracción para bacterias se ocupan dos métodos; extracción por Detergente SDS y Extracción Alcalina. Estas técnicas son las más utilizadas para la investigación de ADN plasmático y cromosómico, lo que diferencia estas dos técnicas es el uso de una solución de NaOH en la extracción alcalina. La extracción alcalina reduce el tiempo de la extracción de ADN porque permite una precipitación más rápida por el uso de NaOH provoca una reacción ácido-base. El inconveniente es la fragmentación de ADN por la agresividad de la reacción. Por ende, existe otra técnica por perlas magnéticas, aprovecha las cargas de. Los ácidos nucleicos se retienen con la ayuda de un imán. Es una de las técnicas más eficientes en comparación con las columnas y los procesos convencionales. Debido a que se necesita poco

equipo para llevarlo a cabo y se obtiene un excelente rendimiento de alta pureza. Se pueden procesar 32 muestras en 45 min en comparación con columnas que requieren 24 muestras. Existe una técnica rápida para el análisis de muestra forenses, Chelex es una resina quelante tiene la función de extraer el ADN por fuerzas iónicas de cualquier muestra hasta la más mínima traza, es el único inconveniente es que solo se puede ocupar para identificación porque no tienen un proceso de purificación, por ende, no permite que el material genético extraído se ocupe en otra técnica molecular.

CONCLUSIÓN

Actualmente se han diseñado diferentes técnicas y herramientas moleculares adaptables que permiten la obtención y aislamiento de material genético, estos métodos moleculares son reproducibles, precisos, robustos y cuantitativos, lo que facilita su aplicación en una gran diversidad de muestras biológicas y por lo tanto con una gran densidad de aplicaciones.

Esto nos permite desarrollar nuevos métodos y proponer protocolos que nos permitirán obtener el material genético de interés. Este proyecto funcionará como material de apoyo y consulta para desarrollar proponer y actualizar este mismo conforme las necesidades requeridas del alumno o profesionalista especializado en biología molecular.

Referencias

- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*, 24(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/s0187-893x\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/s0187-893x(13)72468-6)
- Mellado, O. D. M. (2020, 15 septiembre). TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS. NPunto. <https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-el-diagnostico-de-enfermedades-infecciosas>
- Alejos, L. (2010). Extracción y purificación de ADN. En M. Aragón & A. Cornejo (Eds.), *Extracción y purificación de ADN* (Revisado ed., pp. 1–14). <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
- Mullegama, S. V., Alberti, M. O., Au, C., Li, Y., Toy, T., Tomasian, V., & Xian, R. R. (2018). Nucleic Acid Extraction from Human Biological Samples. *Methods in Molecular Biology*, 359–383. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_30
- Orfao, A., & Morent, M. (2011, mayo). PNT EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS. Instituto de Salud Carlos III.
- Prieto, M. J., Lopez, J., & Pueyo, C. (2010). Purificación de ácidos nucleicos. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, 1(1).

<https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/37%20PURIFICACION%20ACS%20NUCLEICOS.pdf>

- QIAGEN. (2010). QIAamp® RNA blood mini handbook (2.a ed.). QIAGEN.
- QIAGEN. (2014). Gentra® Puregene® Handbook (4.a ed.). QIAGEN.
- QIAGEN. (2016). Gentra® Puregene® handbook (5.a ed.). QIAGEN.
- QIAGEN. (2017). Manual del kit QIAamp® DSP DNA FFPE tissue (1.a ed.). - QIAGEN.
- QIAGEN. (2018). QIAamp® DNA Mini Kit. QIAGEN.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2013). "DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and the Present". BioMed Research International, 2013, 1. <https://doi.org/10.1155/2013/628968>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2014, mayo). TRI REAGENT® - RNA / DNA / PROTEIN ISOLATION REAGENT (TR 118).